



Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation. Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm

Romain Cresson

► To cite this version:

Romain Cresson. Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation. Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur la formation et l'activité du biofilm. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2006. Français. NNT : . tel-02824636

HAL Id: tel-02824636

<https://hal.inrae.fr/tel-02824636>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

***Formation Doctorale : Génie des procédés.
Ecole Doctorale : Sciences et procédés biologiques et industriels***

présentée et soutenue publiquement

par

Romain CRESSON

Titre :

**Etude du démarrage de procédés intensifs de méthanisation
Impact des conditions hydrodynamiques et de la stratégie de montée en
charge sur la formation et l'activité du biofilm**

le 3 Avril 2006 devant la commission d'examen :

JURY

M^{me} H. CARRERE	Chargée de Recherches, INRA Narbonne	, Directrice de Thèse
M. F. FDZ-POLANCO	Professeur, Université de Valladolid	, Rapporteur
M. J.L. THOLOZAN	Directeur de recherche, IRD Marseille	, Rapporteur
M. A. GRASMICK	Professeur, Université de Montpellier II	, Examineur
M. O. THEOBALD	Ingénieur, ADEME Angers	, Examineur
M. N. BERNET	Chargé de Recherches, INRA Narbonne	, Examineur

Remerciements

Les travaux présentés ici ont été réalisés au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de l'INRA à Narbonne, grâce au soutien financier du ministère de l'éducation nationale, de la recherche et de la technologie ainsi que de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. Jean-Philippe Delgenès directeur du LBE pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Mes plus profonds remerciements à Mme Hélène Carrere, MM. Nicolas Bernet, Patrick Dabert, Renaud Escudié et Jean-Philippe Steyer qui ont encadré mon travail. Leur accompagnement, leur soutien et leurs conseils m'ont beaucoup apporté.

Merci à M. Alain Grasmick, professeur à l'université de Montpellier II, d'avoir accepté de présider le jury chargé d'évaluer cette thèse. Je remercie également M. Fernando Fernández-Polanco Fernández de Moreda, professeur à l'université de Valladolid et Jean-Luc Tholozan, Directeur de recherche à l'IRD, rapporteurs de ces travaux, pour leur contribution à la version finale de ce mémoire, ainsi que M. Olivier Theobald, ingénieur ADEME d'avoir bien voulu juger ce manuscrit.

Une partie de ces travaux n'aurait pu être réalisée sans l'aide de MM. Eric Latrille et Thierry Conte, de Mlle Valérie Bru, de MM. Pascal Gras et Philippe Sousbie. Je les remercie pour leur implication et leur disponibilité. Je tiens aussi à remercier les étudiants ayant pris part à la réalisation du travail expérimental : Henri Bastide, Mélanie Ramaut, Renaud Auge, Olivia Eychenne, Vincent Magouët, Frank Correia.

Merci à toute l'équipe du LBE grâce à qui j'ai pu profiter d'un cadre de travail agréable et de grande qualité. Le caractère pluridisciplinaire des équipes réunies à Narbonne m'a beaucoup apporté sur le plan scientifique. Il a contribué à faire de ce travail une expérience particulièrement enrichissante.

Sommaire

INTRODUCTION	10
Préambule	11
Objectifs	13
Organisation du document	14
CHAPITRE I ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I.1 Digestion anaérobie	17
I.1.1 Digestion anaérobie et dépollution	17
I.1.2 Microbiologie de la digestion anaérobie	18
I.1.3 Sulfato-réduction en conditions méthanogènes	24
I.1.4 Conditions physico-chimiques	27
I.1.5 Digestion anaérobie des effluents de l'industrie agroalimentaire	31
I.2 Les procédés anaérobies intensifs	34
I.2.1 Types de réacteurs et procédés à biomasse fixée	35
I.2.2 Performances des procédés anaérobies à biomasse fixée	46
I.2.3 Le support solide	51
I.2.4 Démarrage des digesteurs anaérobies à biomasse fixée	55
I.2.5 Influence du procédé et des conditions opératoires sur la durée du démarrage	61
I.3 Le biofilm	64
I.3.1 Définitions	64
I.3.2 Formation du biofilm	65
I.3.3 Différenciation phénotypique durant le développement du biofilm	73
I.3.4 Composition du biofilm	76
I.3.5 Influence de l'hydrodynamique sur la structure du biofilm	79
I.4 Etude moléculaire des écosystèmes microbiens complexes	82
I.4.1 Approche moléculaire	82
I.4.2 Inventaires moléculaires des ADN ribosomiques	83
I.4.3 Techniques d'empreintes moléculaires	84
I.4.4 Sondes nucléiques et hybridation	87
I.4.5 Limitations méthodologiques	90
I.5 Conclusions de l'analyse bibliographique	92
CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES	94
II.1 Dispositifs expérimentaux	95
II.1.1 Les réacteurs à Lit Turbulé Inverse (LTI)	95
II.1.2 Le réacteur à lit fixe ascendant (LF)	101
II.2 Stratégies de démarrage et de montée en charge	103
II.2.1 Stratégie A : stratégie de l'épuration maximale	104
II.2.2 Stratégie B : stratégie de la charge maximale	104
II.2.3 Stratégie C : Augmentation exponentielle de la charge volumique appliquée	107
II.3 Suivi des réacteurs et méthodes analytiques associées	108
II.3.1 Suivi analytique hors ligne	109
II.3.2 Méthodes de suivi et instrumentation en ligne	114

II.3.3 Bilans massiques.....	115
II.3.4 Définition de paramètres et calculs.....	117
II.4 Techniques de biologie moléculaire	117
II.4.1 Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence	117
II.4.2 Observations microscopiques	119
II.4.3 Caractérisation et suivi moléculaire de la flore des digesteurs	122
CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSIONS	128
III.1 Etude des premières phases de la colonisation bactérienne du support lors de l'inoculation des digesteurs anaérobies à biomasse fixée	131
III.1.1 Mise en évidence de la colonisation précoce du support.....	132
III.1.2 Maturation du biofilm et développement différentiel de certaines espèces bactériennes sur le support.....	135
III.1.3 Conclusions	137
III.2 Impact des conditions hydrodynamiques sur le démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse.....	139
III.2.1 Conditions de démarrage	139
III.2.2 Impact des conditions hydrodynamiques sur la phase de montée en charge	140
III.2.3 Egalisation des contraintes hydrodynamiques	149
III.2.4 Conclusions	151
III.3 Comparaison des stratégies de l'épuration maximale (A) et de la charge maximale (B) et influence de la composition du milieu en éléments traces lors du démarrage de réacteurs à lit turbulent inverse	153
III.3.1 Phase I : acclimatation	155
III.3.2 Phase II : montée en charge et croissance du biofilm en conditions limitantes	160
III.3.3 Phase III : ralentissement de la croissance et carence en micronutriments	164
III.3.4 Phase IV : complémentation en éléments traces métalliques, montée en charge et croissance du biofilm en conditions non limitantes	168
III.3.5 Conclusions	169
III.4 Etude moléculaire des écosystèmes lors de la phase de démarrage des LTI selon les stratégies A et B.	173
III.4.1 Dynamique des populations.....	173
III.4.2 Dégradation de l'éthanol.....	180
III.4.3 Organisation spatiale du biofilm.....	185
III.4.4 Conclusions	188
III.5 Etude comparative des stratégies de montées en charge exponentielles par augmentation de la concentration (C₁) ou du débit d'alimentation(C₂) lors du démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse	189
III.5.1 Conditions opératoires	189
III.5.2 Montée en charge et performances épuratoires	190
III.5.3 Croissance du biofilm : compétition entre biomasse libre et biomasse fixée	197
III.5.4 Activité	203
III.5.5 Conclusions	207
III.6 Optimisation du démarrage d'un réacteur à lit fixe ascendant	208
III.6.1 Conditions opératoires	208
III.6.2 Comparaison des stratégies A (épuration maximale) et C (montée en charge exponentielle).	210
III.6.3 Performances des réacteurs lors de la montée en charge exponentielle	214
III.6.4 Développement du biofilm	218
III.6.5 Conclusions	221

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	224
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	231
ANNEXES.....	261
Annexe 1 - Nomenclature.....	262
Annexe 2 - Liste des figures	264
Annexe 3 - Liste des tableaux	270
Annexe 4 - Publications et communications.....	272

Introduction

Préambule.....	11
Objectifs	13
Organisation du document.....	14

Préambule

En moins d'un siècle la population mondiale a été multipliée par trois et la consommation d'eau par six. Depuis cent ans la consommation d'eau pour les usages industriels a été multipliée par trente. Face à cette consommation accrue, des disparités s'imposent ; douze pourcent de la population mondiale, celle des pays développés, utilisent quatre-vingt-cinq pourcent de l'eau consommée chaque année dans le monde et aujourd'hui, plus de 1,5 milliards de personnes n'ont pas accès à une eau potable saine (Laimé 2003). Les réserves d'eau renouvelables et disponibles par habitant sur la planète qui étaient évaluées par le secrétariat international de l'eau à 17 000 m³ environ en 1950, ne représentaient plus que 7500 m³ en 2000. Dès 2050, la demande d'eau pourrait dépasser l'offre. Dans ces conditions, il apparaît nécessaire de préserver la ressource. Afin de développer un accès large et durable à l'eau, il est donc vital et urgent de mettre en place une politique globale de gestion de la ressource, de promouvoir le développement de l'alimentation en eau, associée systématiquement à des plans d'assainissement et de traitement de la pollution.

A l'échelle des politiques gouvernementales, les deux dernières décennies ont été particulièrement marquées par la prise en compte de la composante « environnement » comme facteur clé du développement économique et social. Au niveau européen, l'objectif fixé et formalisé dans le Livre Blanc élaboré en 1997 ("Energies pour l'avenir : les sources d'énergie renouvelables") est de doubler la part des énergies renouvelables dans le bilan énergétique entre 1997 et 2010. Parallèlement, la mise en vigueur des règlements relatifs aux installations industrielles et plus particulièrement aux normes de rejet des effluents liquides, oblige ce secteur à améliorer continuellement le degré de traitement de ses effluents.

Dans ce contexte, la méthanisation avec valorisation du biogaz produit (production d'énergie thermique et/ou électrique) a toute sa place parmi l'ensemble des diverses solutions de production d'énergies renouvelables en permettant d'atteindre deux objectifs complémentaires : produire de l'énergie tout en réduisant la charge polluante des déchets et des effluents organiques et également, selon la nature du produit de départ, produire un digestat stabilisé utilisable comme fertilisant ou amendement organique. Le désavantage initial des procédés anaérobies lié au faible taux de croissance de la biomasse impliquée dans le processus de biodégradation, qui se traduisait par des réacteurs volumineux et des difficultés opérationnelles, a pu être surmonté grâce au développement d'une nouvelle

génération de réacteurs dans lesquels la biomasse est piégée sous la forme de biofilms ou d'agrégats cellulaires.

Aujourd'hui les principales applications industrielles bénéficiant des apports de la méthanisation pour le traitement de leurs rejets sont identifiées par l'Agence gouvernementale De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) comme étant : la digestion agricole (déjections animales), la digestion des déchets solides ménagers et assimilés (biodéchets), la digestion des boues urbaines et la digestion des effluents industriels (Fruteau *et al.* 2004). Concernant ce dernier domaine d'application, la méthanisation est un traitement très compétitif par rapport à l'épuration aérobie. Elle est appliquée principalement pour traiter les effluents des industries agroalimentaires fortement chargés et les effluents de la fermentation (75% des digesteurs à forte charge en opération) comme illustré à la Figure II.2.

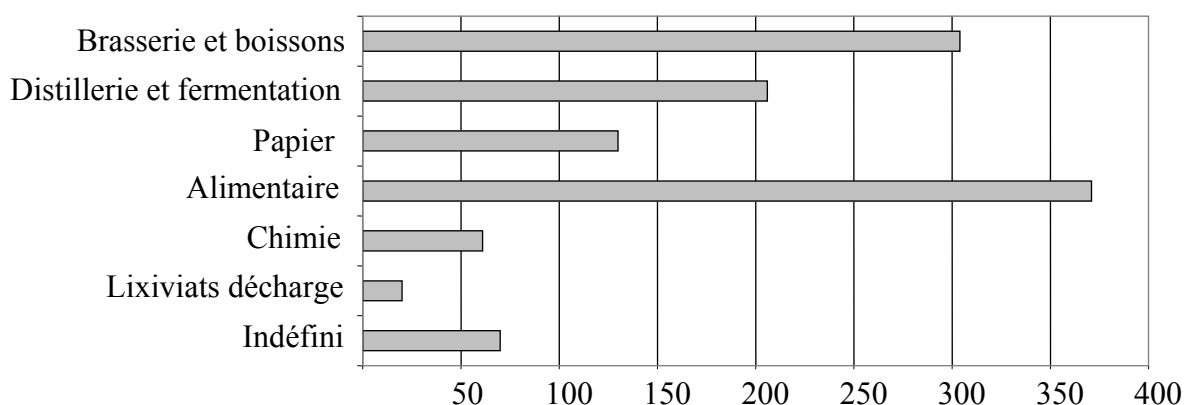


Figure 1 : Le traitement par méthanisation des effluents industriels dans le monde : nombres d'installation par type d'industrie (Fruteau *et al.* 2004)

Dans l'industrie, le choix d'intégrer la méthanisation se fonde dans la majorité des cas sur une analyse " comparative " coûts /performances de cet investissement par rapport aux autres technologies d'élimination des matières organiques fermentescibles, laissant de fait peu de place aux considérations liées à la valorisation potentielle des sous produits (y compris du biogaz) ou à l'impact environnemental réduit et au caractère durable de cette technologie.

Cependant, certaines enquêtes (Bordeau 2004) ont révélé que dans nombre de cas, la logique coût/performance n'est pas la première raison invoquée du choix de la méthanisation. D'autres critères, essentiellement centrés sur le thème de la prise en compte de l'environnement (limitation rejets de polluants et de gaz à effet de serre) et du passage à des modèles de " gestion durable " (production d'énergie renouvelable), sont alors mis en avant.

Quel que soit son intérêt économique direct ou ses vertus environnementales, la digestion anaérobie ne s'impose cependant pas comme elle le devrait si les marchés se comportaient de

façon purement rationnelle. Les raisons de ce décalage souvent citées sont diverses : sa "dangerosité" due à la présence de gaz, son manque apparent de flexibilité, les craintes que suscitent sa complexité, la difficulté et la durée de la phase de démarrage. La plupart de ces obstacles qui résultent encore pour l'essentiel du manque de maîtrise scientifique et technique sont surmontables grâce à l'étude des aspects fondamentaux des procédés biotechnologiques. Les connaissances ainsi générées doivent permettre une meilleure maîtrise des processus, visant la mise au point de procédés plus performants répondant aux attentes des utilisateurs.

Objectifs

Le démarrage des réacteurs intensifs de digestion anaérobie à biomasse fixée est une étape clé encore mal maîtrisée. La durée et la difficulté de mise en œuvre de cette phase demeurent des obstacles majeurs à une large application de ce type de procédés au niveau industriel. Cette étape est étroitement liée à la formation et à la maturation d'un biofilm actif et conditionne largement les performances du système.

Les travaux présentés ici ont pour objectif de contribuer à la compréhension des mécanismes de mise en place et de maturation des biofilms anaérobies, afin de mieux contrôler leur formation et réduire ainsi la durée de la phase de démarrage des bioréacteurs. Cette étude consiste à analyser l'impact de paramètres hydrodynamiques et de la stratégie de montée en charge sur les caractéristiques du biofilm (épaisseur, densité, biodiversité) et sur son activité (respirométrie anaérobie, cinétiques de dépollution) lors de son développement.

Ce projet nécessite une appréhension globale qui implique une approche pluridisciplinaire faisant intervenir des connaissances en biologie moléculaire, physiologie microbienne, biochimie et génie des procédés. Ainsi, une démarche analytique combinant l'étude macroscopique des performances du procédé à une approche microscopique basée sur les méthodes moléculaires (inventaire et dynamique de l'écosystème microbien) doit permettre de mieux comprendre les interactions entre la physiologie, la dynamique des populations mixtes et les conditions de mise en œuvre des bioréacteurs anaérobies lors de leur phase de démarrage.

Les connaissances à créer constituent une base de données précieuse pour le développement de tous les procédés anaérobies à biofilms. Elles pourront être mises à profit pour adapter les conditions opératoires des bioréacteurs afin d'optimiser la formation du biofilm et le démarrage des procédés intensifs de digestion anaérobie à biofilm

Organisation du document

Le Chapitre I constitue une synthèse bibliographique. Après avoir rappelé le principe de la digestion anaérobie, décrit les procédés à biomasse fixée et situé la problématique de leur démarrage, nous présenterons les mécanismes de développement du biofilm ainsi que les différentes approches permettant d'étudier la dynamique des pollutions microbiennes.

Le Chapitre II présente les procédés utilisés durant la thèse ainsi que les méthodes développées et les techniques employées pour le suivi opérationnel des réacteurs et l'inventaire moléculaire.

Le Chapitre III consiste en une présentation détaillée et une analyse des résultats obtenus. Une première phase de l'étude a été menée sur des réacteurs à Lit Turbulé Inverse (LTI) de laboratoire. Dans un premier temps des études sont réalisées afin d'apporter des connaissances supplémentaires sur le contact initial entre les cellules et la surface solide ainsi que sur la mise en place d'un biofilm actif. Dans un second temps, le suivi simultané de deux réacteurs a permis d'analyser l'influence de stratégies de montée en charge sur la mise en place et la maturation d'un biofilm anaérobie et la dynamique des populations. Les stratégies sont basées sur différents paramètres tels que la durée de la phase d'inoculation, les contraintes hydrodynamiques (imposées par la vitesse de recirculation du biogaz), le paramètre de contrôle de la montée en charge et le temps de séjour hydraulique. Il s'agira d'établir des conditions opératoires optimales afin d'obtenir un démarrage efficace et rapide des réacteurs avec un contrôle actif de l'épaisseur du biofilm.

Lors d'une seconde phase, les résultats obtenus sur les stratégies de démarrage des LTI sont transposés et validés sur un réacteur de plus grande capacité (1m^3), de configuration différente (lit fixe) et alimenté par un effluent réel (vinasse de distillerie).

Chapitre I

Analyse bibliographique

I.1	Digestion anaérobie	17
I.1.1	Digestion anaérobie et dépollution	17
I.1.2	Microbiologie de la digestion anaérobie.....	18
I.1.3	Sulfato-réduction en conditions méthanogènes	24
I.1.4	Conditions physico-chimiques.....	27
I.1.5	Digestion anaérobie des effluents de l'industrie agroalimentaire.....	31
I.2	Les procédés anaérobies intensifs	34
I.2.1	Types de réacteurs et procédés à biomasse fixée.....	35
I.2.2	Performances des procédés anaérobies à biomasse fixée	46
I.2.3	Le support solide.....	51
I.2.4	Démarrage des digesteurs anaérobies à biomasse fixée	55
I.2.5	Influence du procédé et des conditions opératoires sur la durée du démarrage.....	61
I.3	Le biofilm	64
I.3.1	Définitions	64
I.3.2	Formation du biofilm.....	65
I.3.3	Différenciation phénotypique durant le développement du biofilm	73
I.3.4	Composition du biofilm.....	76
I.3.5	Influence de l'hydrodynamique sur la structure du biofilm.....	79
I.4	Etude moléculaire des écosystèmes microbiens complexes.....	82
I.4.1	Approche moléculaire.....	82
I.4.2	Inventaires moléculaires des ADN ribosomiques.....	83
I.4.3	Techniques d'empreintes moléculaires.....	84
I.4.4	Sondes nucléiques et hybridation	87
I.4.5	Limitations méthodologiques	90
I.5	Conclusions de l'analyse bibliographique	92

I.1 Digestion anaérobie

I.1.1 Digestion anaérobie et dépollution

La digestion anaérobie peut être mise en place pour traiter des rejets organiques aussi divers que des eaux usées, des boues de station d'épuration, des déjections animales, des déchets d'industries agro-alimentaires, des ordures ménagères, etc. Différents procédés de méthanisation ont été adaptés aux différentes catégories de déchets avec pour objectif, soit de simplifier le procédé pour minimiser le coût de fonctionnement, soit d'améliorer les rendements en utilisant une technologie plus complexe. Le traitement par digestion anaérobie des effluents industriels à forte charge organique comme ceux des industries agro-alimentaires possède de nombreux avantages par rapport au traitement aérobie (boue activée, lagunage aéré, lits bactériens) :

- la réduction du volume de boues produites par un facteur 5 à 10 car les bactéries de la communauté microbienne n'utilisent qu'environ 10 à 15% de l'énergie du substrat pour leur croissance (Moletta 1993; Schink 1997) ;
- la valorisation potentielle du biogaz produit (*i.e.*, production d'énergie par combustion du méthane, le biogaz étant constitué à environ 65 à 70% de méthane) ;
- la diminution du coût énergétique par suppression du transfert d'oxygène ;
- la possibilité de traiter des charges organiques élevées : de 2 à plus de 80 kg de DCO par mètre cube de réacteur et par jour avec des taux d'épuration de 80 à 98% ;
- la possibilité de traiter des effluents déséquilibrés ou limités en azote et en phosphore.

La digestion anaérobie présente cependant certains inconvénients :

- du fait de la faible vitesse de croissance bactérienne, la cinétique d'épuration est lente et les périodes de démarrage des réacteurs relativement longues ;
- les populations microbiennes sont sensibles aux perturbations, en particulier à l'oxygène et aux métaux lourds (Edeline 1997) ou encore aux surcharges organiques et le procédé se révèle souvent instable ;
- le traitement par digestion anaérobie est souvent insuffisant pour rejeter directement les effluents dans le milieu naturel : un post-traitement aérobie de finition est nécessaire pour achever l'élimination du carbone et éventuellement de l'azote et du phosphore.

I.1.2 Microbiologie de la digestion anaérobie

Lors du processus de digestion anaérobie, la conversion de composés organiques complexes en méthane et en dioxyde de carbone est réalisée par l'action concertée de microorganismes appartenant à une communauté microbienne complexe, tant d'un point de vue taxonomique que fonctionnel. Godon *et al.* (1997a) ont recensé près de 140 "espèces" sur un inventaire de 579 individus dans un digesteur. Ces populations mixtes de microorganismes sont majoritairement organisées sous la forme de biofilms ou d'agrégats granulaires (Shapiro 1998). Plus les substances présentes dans les eaux usées sont complexes, plus il y aura d'espèces microbiennes différentes présentes dans ces biofilms (Azbar *et al.* 2001). Le modèle développé par Zeikus (1980) pour décrire le processus de méthanisation fait consensus (Figure I.1) ; il comprend quatre étapes, réalisées par différents groupes de microorganismes. Chaque étape mène à la formation de composés intermédiaires, servant à leur tour de substrats lors de la phase suivante. Chaque étape est maintenant détaillée.

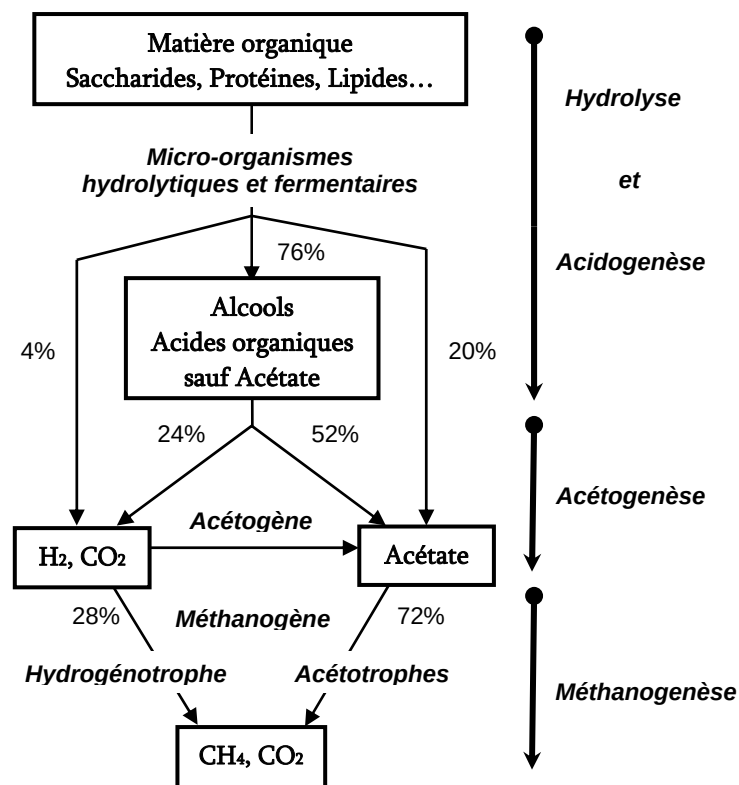


Figure I.1 : Schéma de la chaîne trophique de la méthanogenèse et ses différentes étapes (Zeikus 1980; Thiele 1991; Moletta 1993).

I.1.2.1 Hydrolyse et acidogenèse

Lors de l'hydrolyse, les macromolécules comme les polysaccharides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont clivées, généralement par des enzymes spécifiques extracellulaires, jusqu'à l'obtention de monomères (monosaccharides, acides gras, acides aminés et bases azotées) qui sont transportés à l'intérieur de la cellule où ils sont fermentés. Les bactéries participant à cette étape ont un métabolisme de type anaérobie strict ou facultatif (Archer *et al.* 1990) et forment un ensemble phylogénétique hétérogène regroupant de nombreux groupes bactériens (Colberg 1988; McInerney 1988).

Au cours de l'acidogenèse, ces monomères sont métabolisés par des microorganismes fermentaires pour produire principalement des acides gras volatils (AGV) (acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate), mais aussi des alcools, du sulfure d'hydrogène (H_2S), du CO_2 et de l'hydrogène. Cette étape mène ainsi à des produits de fermentation simplifiés. Les bactéries qui participent à cette étape peuvent être anaérobies strictes ou facultatives avec un temps de duplication très court (de 30 minutes à quelques heures). Les bactéries anaérobies strictes du genre *Clostridium* constituent souvent une fraction importante de la population anaérobie qui participe à l'étape d'acidogenèse, bien que d'autres groupes bactériens comme la famille des *Enterobacteriaceae* ou encore les genres *Bacteroides*, *Bacillus*, *Pelobacter*, *Acetobacterium* et *Ulyobacter* puissent être impliqués. La vitesse de cette étape est très élevée par rapport aux étapes suivantes où les micro-organismes ont un temps de duplication plus long. En conditions de surcharge organique, le métabolisme plus rapide de ce groupe trophique entraîne une accumulation d'intermédiaires en particulier d'hydrogène et d'acétate. Ces métabolites ont une action inhibitrice sur les microorganismes acétogènes et méthanogènes et peuvent être responsables de l'arrêt de la digestion anaérobie (Thiele 1991).

I.1.2.2 Acétogenèse

L'étape d'acétogenèse permet la transformation des divers composés issus de la phase précédente en précurseurs directs du méthane : l'acétate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène. On distingue deux groupes de bactéries acétogènes :

- les bactéries productrices obligées d'hydrogène

Ce sont des bactéries anaérobies strictes, également appelées OHPA (« Obligate Hydrogen Producing Acetogens »). Elles sont capables de produire de l'acétate et de l' H_2 à partir des métabolites réduits issus de l'acidogenèse tels que le propionate et le butyrate. Il faut noter

que ces bactéries ont un temps de dédoublement assez long, de l'ordre de 1 à 7,5 jours (Boone *et al.* 1980; McInerney *et al.* 1981; Roy *et al.* 1986).

Tableau I.1 : Temps de génération à 35°C des bactéries syntrophes connues, isolées de digesteurs, avec différents partenaires.

Syntrophe	Source d'énergie et de carbone	Partenaire du syntrophe	Tg (*)	Référence
<i>Syntrophomonas wolfei</i>	Butyrate	<i>Desulfovibrio sp.</i>	2,2 jours	(McInerney <i>et al.</i> 1981)
		<i>M. hungatei</i> (*)	3,7 jours	
	Valérate	<i>M. hungatei</i>	3,7 jours	(Roy <i>et al.</i> 1986)
	Caproate	<i>M. hungatei</i>	7,5 jours	
<i>Syntrophomonas sapovorans</i>	Butyrate	<i>M. hungatei</i>	1,1 jours	
	Oléate	<i>M. hungatei</i>	1,6 jours	(Boone <i>et al.</i> 1980)
	Stéarate	<i>M. hungatei</i>	1,9 jours	
<i>Syntrophomonas wolinii</i>	Propionate	<i>Desulfovibrio sp.</i>	3,6 jours	(Boone <i>et al.</i> 1980)
		<i>M. hungatei</i>	7,5 jours	

(*) Tg : Temps de génération minimum ; *M. hungatei* = *Methanospirillum hungatei*.

La thermodynamique des réactions catalysées par ces bactéries acétogènes est défavorable ($\Delta G^0 > 0$) dans les conditions standards (concentration des réactifs = 1M ; pression des gaz = 1 atm). Elles ne deviennent possibles qu'à des pressions partielles d' H_2 très faibles, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} atm (Cf. Tableau I.2). L'accumulation d'hydrogène traduit un dysfonctionnement manifeste et conduit inévitablement à l'arrêt de l'acétogénèse (Dolfing 1988; Widdel 1988; Guyot 1990; Thiele 1991; Wu *et al.* 1991). Ceci implique la nécessité d'une élimination constante de l'hydrogène produit. Cette élimination peut être réalisée grâce à l'association syntrophique de ces bactéries avec des microorganismes hydrogénotrophes, idéalement les *Archaea* méthanogènes, qui vont consommer l'hydrogène produit.

Tableau I.2 : Equation et énergie libre des réactions de dégradation anaérobie de l'éthanol, du propionate et du butyrate.

	ΔG^0 (kJ)	ppH ₂ (atm) à partir de laquelle $\Delta G^{*'} < 0$
$CH_3CH_2OH + H_2O \rightleftharpoons CH_3COO^- + 2H_2 + H^+$	+9,65	$< 10^{-1}$
$CH_3CH_2COO^- + 2 H_2O \rightleftharpoons CH_3COO^- + 3H_2 + CO_2$	+71,67	$< 3.10^{-5}$
$CH_3(CH_2)_2COO^- + 2H_2O \rightleftharpoons 2 CH_3COO^- + 2H_2 + H^+$	+48,10	$< 6.10^{-5}$

Les valeurs de ΔG^0 sont calculées à partir des enthalpies libres de formation des composés données par Thauer *et al.* (Thauer *et al.* 1977) ; $\Delta G^{*'}$ est calculée en modifiant seulement la pression partielle en H_2 par rapport à ΔG^0

- les bactéries acétogènes non syntrophes

Le métabolisme de ces bactéries est majoritairement orienté vers la production d'acétate. Elles se développent dans les milieux riches en CO_2 , ce qui est très souvent le cas des niches

anaérobies. Elles sont pour la plupart autotrophes (Dolfing 1988). On divise classiquement les bactéries acétogènes non syntrophes en deux groupes. Un premier groupe est formé des bactéries qui produisent de l'acétate, du butyrate et d'autres composés à partir de sucres simples : les bactéries de ce groupe sont classées en plusieurs genres tels que *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Clostridium*, *Sporomusa*, etc ... (Dolfing 1988).

Les bactéries « homo-acétogènes » constituent le second groupe, elles utilisent l'hydrogène et le dioxyde de carbone pour produire de l'acétate selon la réaction suivante :

	ΔG° (kJ)
$2\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-104.6
ΔG° sont calculées à partir des enthalpies libres de formation des composés données par Thauer <i>et al.</i> (Thauer <i>et al.</i> 1977)	

Les bactéries de ce second groupe appartiennent essentiellement au genre *Clostridium*. Elles ne semblent pas entrer en compétition pour l'hydrogène avec les *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes et sont présentes en quantité beaucoup plus faible dans les biotopes anaérobies. Elles ont pu toutefois être identifiées comme partenaires hydrogénotrophes de syntrophes (Tschech *et al.* 1985; Tschech *et al.* 1986).

I.1.2.3 Méthanogenèse

Au cours de cette dernière étape, les produits de la deuxième étape sont convertis en méthane par des microorganismes anaérobies stricts qui appartiennent au domaine des *Archaea*. Ils utilisent essentiellement comme substrat l'acétate, le formate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène pour produire du méthane. Leur temps de doublement compris entre 3,4 heures (*Methanogenium thermophilicum* (Huser *et al.* 1982)) et 7 jours (*Methanosaeta soehngenii* (Gujer *et al.* 1983)) est globalement plus court que celui des bactéries acidogènes. La production de méthane dans un digesteur est classiquement décrite comme étant réalisée par deux grandes catégories d'*Archaea* méthanogènes :

- les méthanogènes hydrogénophiles (ou hydrogénotrophes)

Elles tirent leur énergie de la production de méthane par réduction du dioxyde de carbone ou de l'acide formique par l'hydrogène selon les réactions présentées dans le tableau ci-après :

Tableau 3 : Equation et énergie libre des réactions de formation de méthane à partir de l'hydrogène du dioxyde de carbone et du formate.

	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ)	ppH ₂ (atm) à partir de laquelle $\Delta G^{*'} < 0$ > 10^{-6}
$4\text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$	-135,6	> 10^{-6}
$\text{HCOO}^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-134,06	> 10^{-6}

Les valeurs de $\Delta G^{\circ'}$ sont calculées à partir des enthalpies libres de formation des composés données par Thauer *et al.* (Thauer *et al.* 1977). $\Delta G^{*'}$ est calculée en modifiant seulement la pression partielle en H₂ par rapport à $\Delta G^{\circ'}$

Comme nous l'avons précédemment mentionné, les *Archaea* méthanogènes hydrogénophiles vivent en association syntrophique avec les bactéries fermentaires qui leur fournissent en continu le dioxyde de carbone et l'hydrogène. Elles jouent ainsi un rôle important dans le maintien d'une faible pression en hydrogène, favorisant la croissance des bactéries acétogènes. Pour permettre la formation de méthane, la pression partielle en hydrogène ne doit toutefois pas être inférieure à 10^{-6} atm. Comme le montre la Figure I.2, il existe donc une niche énergétique correspondant à une association de ces micro-organismes. Elle est délimitée par les valeurs de l'énergie libre de plusieurs réactions en fonction de la pression partielle en hydrogène.

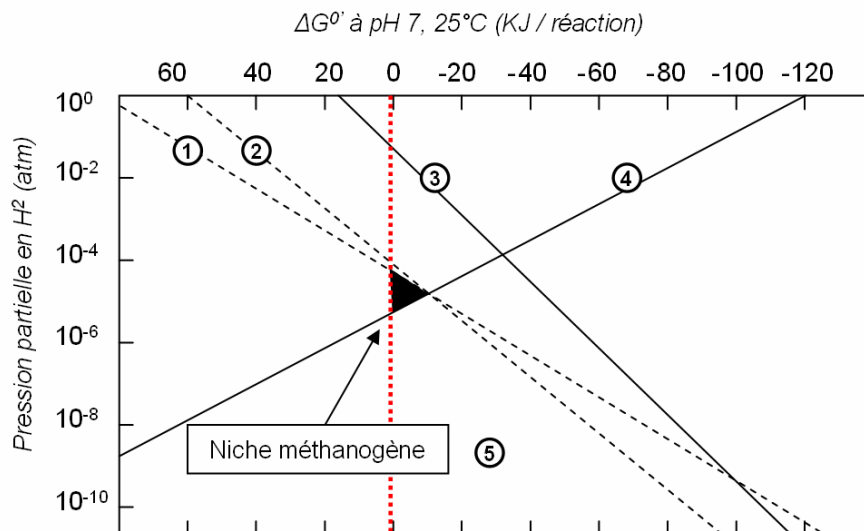


Figure I.2 : Evolution de l'énergie libre de Gibbs ($\Delta G^{*'}$) des réactions de conversion de l'éthanol, du propionate, du butyrate en acétate et de la production de méthane à partir de H₂/CO₂ en fonction de la pression partielle en hydrogène. [propionate] = [butyrate] = [éthanol] = [acétate] = 1 mM ; [HCO₃⁻] = 100 mM ; pression en CH₄ = 0,5 atm. 1, 2 et 3 : acétogénèse du propionate, du butyrate et de l'éthanol, 4 et 5 : méthanogénèse autotrophe (H₂, CO₂) et acétoclaste.

Les genres les plus représentés sont *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, *Methanogenium*, *Methanocorpusculum* (Archer *et al.* 1990). La réduction du dioxyde de carbone par l'hydrogène met en œuvre nombre d'intermédiaires, d'enzymes et

de coenzymes, en particulier le facteur F430 contenant un atome de nickel, le facteur F420 (fluorescent à 420nm), le facteur III qui possède un noyau corrinique au centre duquel se trouve un atome de cobalt, et bien entendu le coenzyme M spécifique de la méthanogenèse (Ferry 1999).

- les méthanogènes acétoclastes (ou acétotrophes)

Ces organismes produisent du méthane à partir d'acide acétique, de méthanol et de méthylamine. Les deux genres les plus fréquemment rencontrés dans un digesteur sont *Methanosarcina* et *Methanosæta* (ou *Methanothrix*) (Morgan *et al.* 1991). Les *Archaea* du genre *Methanosaeta* utilisent l'acétate comme unique source de carbone pour produire le méthane selon la réaction suivante :



Les valeurs de ΔG° sont calculées à partir des enthalpies de formation des composés données par Thauer *et al.* (Thauer *et al.* 1977)

Les *Archaea* du genre *Methanosarcina* présentent un plus large spectre de substrats : elles peuvent utiliser en plus de l'acétate, le dioxyde de carbone, l'hydrogène, le méthanol et les méthylamines pour former le méthane. Ces réactions de méthanogenèse acétoclaste sont lentes et peu exothermiques ; elles génèrent néanmoins plus de 70 % du méthane produit (Thauer *et al.* 1977; Tholozan 1988).

Au niveau des digesteurs dans lesquels des concentrations en acétate inférieures à 5 mM sont observées dans les conditions normales d'alimentation, les *Archaea* du genre *Methanosarcina* ont un avantage écologique certain et prédominant souvent par rapport au genre *Methanosaeta*. Ce rapport est inversé en présence de fortes concentrations en acétate. Il faut aussi noter qu'en ce qui concerne le dioxyde de carbone et l'hydrogène, les *Methanosarcina* ne sont pas compétitives (K_s élevé, faible $\mu_{\max}$) vis à vis de méthanogènes hydrogénophiles. Aussi, dans les digesteurs, elles tirent majoritairement leur énergie de l'acétate ou du méthanol quand ce dernier est présent dans les effluents (Archer *et al.* 1990).

I.1.3 Sulfato-réduction en conditions méthanogènes

I.1.3.1 *Microbiologie*

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) utilisent comme accepteur terminal d'électrons le sulfate (SO_4^{2-}) qu'elles réduisent en sulfure (S^{2-}) et également le sulfite (SO_3^{2-}) et le thiosulfate ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) qui sont transformés en sulfure. Les BSR sont des dégradeurs terminaux de la matière organique comme les méthanogènes. L' H_2S produit au cours de ce métabolisme a, de plus, un effet néfaste sur les organismes méthanogènes, soit par inhibition directe, soit par précipitation des métaux essentiels qu'elles nécessitent pour leur croissance (Zehnder *et al.* 1982). Longtemps considérées comme anaérobies strictes, elles seraient plutôt microaérophiles, capables de réduire le sulfate en conditions de microaération, de respirer l'oxygène à une faible pression partielle ou de l'utiliser pour oxyder les sulfures (Okabe *et al.* 1998; Ito *et al.* 2002; Okabe *et al.* 2003). Les BSR ont en général une température optimale de croissance comprise entre 28 et 32°C (Stefanie *et al.* 1994; Hao *et al.* 1996).

Les BSR sont largement présentes dans les écosystèmes de digestion anaérobie. De nombreux auteurs les ont ainsi identifiées dans des structures de types biofilms ou granules anaérobies (Oude Elferink *et al.* 1994; Stefanie *et al.* 1994; Lens *et al.* 1995; Percheron *et al.* 1997; Stams *et al.* 2005). D'un point de vue taxonomique, trois groupes de sulfato-réductrices peuvent être distingués : des eubactéries Gram -, Gram + et des *Archaea* (Barton *et al.* 1995; Fauque 1995) qui contiennent des intermédiaires très proches, voire identiques à ceux rencontrés chez les méthanogènes, par exemple le méthanol et le coenzyme F420 (Thauer 1998).

Du point de vue métabolique, elles sont divisées en deux groupes (Postgate 1984) :

- Les BSR du premier groupe utilisent le lactate comme source de carbone et d'énergie et l'oxydant de manière incomplète en acétate et CO_2 . Elles peuvent également utiliser comme substrat un nombre limité de produits issus de la première étape de la fermentation méthanique tels que l'éthanol, le fumarate, le malate, le pyruvate, etc. Les bactéries des genres *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomicrobium*, *Desulfohalobium*, *Desulfobotulus*, *Desulfomonile*, *Thermodesulfobacterium* et *Desulfobulbus* sont classées dans ce groupe.
- Les bactéries du deuxième groupe oxydent de manière complète jusqu'au CO_2 l'acétate ainsi que certains acides gras à longue chaîne et certains composés aromatiques, mais également des substrats communs aux BSR du premier groupe. Les genres qui

appartiennent à ce groupe sont *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfoarculus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Archaeoglobus*.

Les BSR isolées des digesteurs appartiennent surtout au genre *Desulfovibrio* mais des espèces de *Desulfobulbus* et *Desulfotomaculum* ont également été rencontrées (Brune 1983; Zellner *et al.* 1987; Dubourguier *et al.* 1988; Tasaki *et al.* 1991; Wu *et al.* 1991).

I.1.3.2 Compétitions trophiques interspécifiques

En présence d'une concentration non limitante en sulfate, les BSR entrent en compétition avec de *Archaea* méthanogènes pour les substrats communs : hydrogène, dioxyde de carbone et acétate. L'avantage est en faveur des BSR qui présentent de plus faibles K_s et des taux de croissance plus élevés (μ_{max}) pour les deux substrats (Kristjanson *et al.* 1982; Speece 1983 a; Widdel 1988; Archer *et al.* 1990). En présence de sulfate, le flux de carbone et d'énergie est donc dévié vers la sulfato-réduction aux dépens de la méthanogenèse.

Les BSR peuvent également se développer en l'absence de sulfate. Elles tirent alors leur énergie de l'oxydation de composés organiques de faible poids moléculaire : acides organiques (lactate, pyruvate, formate, malate), acides gras volatils (acétate), alcools (éthanol, propanol, méthanol, butanol) (Stefanie *et al.* 1994). De plus, certaines sulfato-réductrices fermentaires ou acétogènes sont capables d'établir un transfert inter espèces d'hydrogène avec les bactéries méthanogènes.

En condition de limitation en sulfate, le propionate peut ainsi être oxydé par des BSR en association syntrophique avec des méthanogènes hydrogénotrophes (Ruel *et al.* 2002). Toutefois, en présence de sulfate ces bactéries oxydent préférentiellement le propionate par réduction simultanée du sulfate. Ces syntrophes facultatives ont donc un avantage écologique par rapport aux syntrophes obligatoires, notamment dans un environnement variable (Stams *et al.* 2005).

Tableau I.3 : Données thermodynamiques sur la sulfato-réduction (Stams *et al.* 2005)

	ΔG° , (kJ)
Oxydation de l'acétate	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
Oxydation de l'éthanol	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \frac{1}{2} \text{HS}^- + \frac{1}{2} \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-46.5
Oxydation du propionate	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + \frac{3}{4} \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \frac{3}{4} \text{HS}^- + \frac{1}{4} \text{H}^+$	-37.7
Oxydation du butyrate	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + \frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons 2 \text{CH}_3\text{COOH} + \frac{1}{2} \text{HS}^- + \frac{1}{2} \text{H}^+$	-27.8
Oxydation de l'hydrogène	
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	-151.9
Oxydation du thiosulfate	
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{SO}_4^{2-} + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-22
$4\text{SO}_3^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons 3 \text{SO}_4^{2-} + \text{HS}^-$	-236

Les valeurs de ΔG° sont calculées à partir des enthalpies de formation des composés données par Thauer *et al.* (Thauer *et al.* 1977).

Les interactions entre les deux populations dépendent également de facteurs écologiques qui peuvent être déterminants par rapport aux considérations thermodynamiques et cinétiques (Stams *et al.* 2005). Dans un biofilm, les méthanogènes peuvent être plus abondantes que les BSR en raison de la limitation du transfert du sulfate et à cause des propriétés d'agrégation des sulfato-réductrices généralement moins bonnes (Okabe *et al.* 2003). Notons que des BSR acétoclastes sont capables de s'attacher à des particules solides et de croître dans des boues granulaires (Oude Elferink *et al.* 1998).

Un autre paramètre déterminant des interactions entre les méthanogènes et les BSR est le rapport entre la charge organique et la charge en sulfate (Yoda *et al.* 1987; Percheron *et al.* 1997; Stams *et al.* 2005). Un rapport faible élimine toute activité méthanogène du milieu. Un rapport élevé entraîne la prédominance de la méthanogenèse et la présence de BSR utilisant des voies métaboliques différentes de la sulfato-réduction (Figure 2.6).

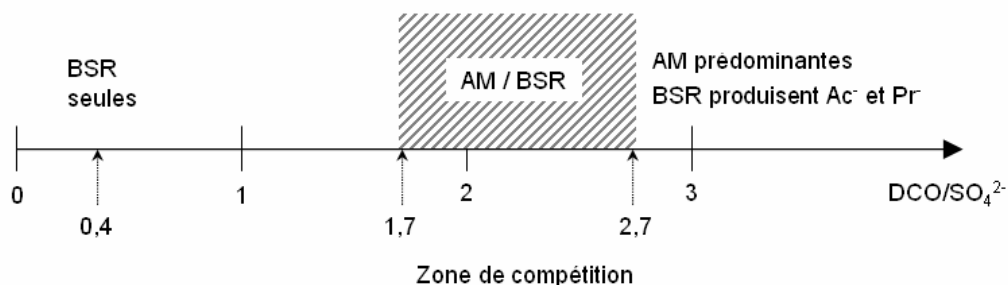


Figure I.3 : Compétition entre les bactéries sulfato-réductrices et les *Archaea* méthanogènes en fonction du rapport entre la charge organique et la concentration de sulfate (Hao *et al.* 1996). AM: *Archaea* méthanogènes; BSR : bactéries sulfato-réductrices; Ac⁻ : acétate; Pr⁻ : propionate; DCO : demande chimique en oxygène

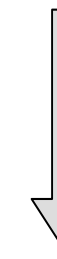
En résumé, même si les conditions méthanogènes prédominent, il est possible de trouver des BSR capables d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que le sulfate. Elles ont alors un métabolisme fermentaire ou acétogène, avec production d'acétate et de propionate ; elles peuvent également former une association syntrophique avec les méthanogènes hydrogénotrophes.

I.1.4 Conditions physico-chimiques

I.1.4.1 Accepteurs d'électrons

En conditions anoxiques, à potentiel redox décroissant, le rôle d'accepteur final d'électrons est réalisé successivement par le nitrate, le sulfate, le manganèse et le fer. Le fer et le manganèse ne sont probablement pas des accepteurs majeurs parce qu'ils sont très peu solubles, et ils sont donc présents essentiellement sous la forme d'oxydes ou d'hydroxydes peu disponibles pour les microorganismes. Par ailleurs, les données sur la réduction biologique du manganèse sont insuffisantes (Ginter *et al.* 1997; Ludvigsen *et al.* 1998). Une fois les sulfates consommés, le milieu devient sous l'influence des microorganismes méthanogènes. Le métabolisme méthanogène ne nécessite pas forcément de source d'accepteurs d'électrons externes, en l'occurrence de source de CO₂ (accepteur final d'électrons dans le métabolisme méthanogène si nécessaire), les bactéries fermentaires métabolisant la matière organique complexe principalement en acétate, hydrogène (tous deux possibles donneurs d'électrons) et dioxyde de carbone (possible accepteur d'électrons).

Tableau I.4 : Principaux accepteurs d'électrons inorganiques participant au processus d'atténuation naturelle (Quintard *et al.* 2004)

Accepteur	Espèce réduite	Milieu	Séquence	Source
O ₂	H ₂ O	Aérobie		Atmosphère
NO ₃ ⁻	N ₂	Anaérobie		Protéines
Mn (IV)	Mn(II)			Exogène (contamination)
Fe (III)	Fe(II)			Exogène (contamination)
SO ₄ ²⁻	S ²⁻ (H ₂ S)			Dégradation de la cystéine ou Exogène
CO ₂	CH ₄			Carbonates, dégradation de la Matière Organique.

Les conditions thermodynamiques dépendent du couple oxydant-réducteur mais également de la concentration du donneur d'électrons et des concentrations des différents accepteurs d'électrons. Ainsi, un accepteur d'électrons trop peu soluble ou en trop faible concentration par rapport aux autres accepteurs d'électrons ne permettra pas de donner

l'avantage à ses utilisateurs. L'approche thermodynamique permet de distinguer les réactions possibles mais ne donne pas les valeurs des cinétiques de réaction, même si la thermodynamique influence la cinétique : plus l'énergie libérée par la réaction est importante, plus la population bactérienne catalysant cette réaction est favorisée et se développe rapidement (Stryer 1992).

I.1.4.2 Potentiel rédox

Vogels *et al.* (Vogels *et al.* 1988) définissent un milieu anaérobie lorsqu'il possède un potentiel rédox de -300 à -500 mV. La Figure I.4 présente les potentiels rédox des demi-couples impliqués lors de la dégradation de la matière organique. L'échelle des potentiels rédox Eh (mV) est donnée pour un pH de 7 et une P_{CO_2} de 10^{-2} atm. Les ΔG° sont données en kJ par mole d'électrons. Les *Archaea* méthanogènes sont des microorganismes anaérobies stricts, et des traces d'oxygène suffisent à les tuer, en grande partie par auto-oxydation de certains cofacteurs essentiels à leur métabolisme énergétique. Elles ne se développent qu'à de très faibles potentiels d'oxydoréduction (Eh) (-330 mV d'après Demeyer (Demeyer *et al.* 1981), autour de -400mV selon Oremland (Oremland 1988) et entre -430 et 520 mV d'après Jee *et al.* (Jee *et al.* 1988)).

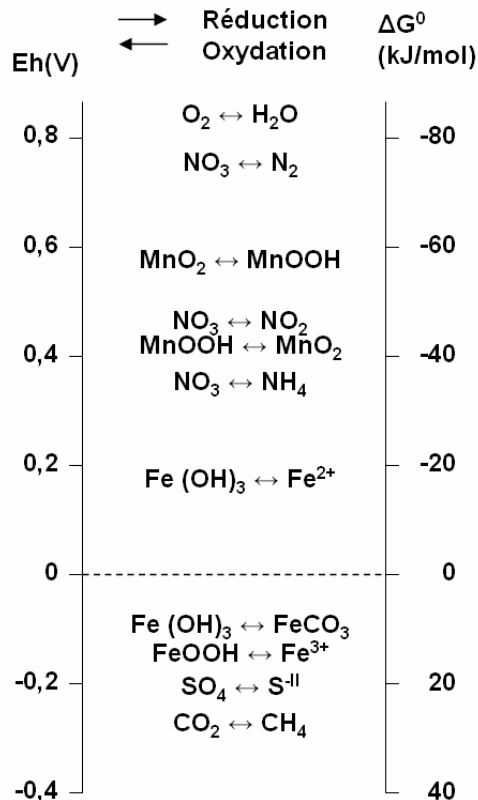


Figure I.4 : Potentiel rédox des demi-couples impliqués dans les réactions biochimiques

I.1.4.3 Température

La température est un paramètre important pour les procédés biologiques car elle affecte la cinétique de croissance des microorganismes et le transfert de matière. Selon la plage de températures dans laquelle ils peuvent proliférer, les microorganismes sont classifiés en trois catégories : les psychrophiles (qui tolèrent une gamme de température de 10 à 30°C, avec un optimum de 12 à 18°C), les mésophiles (de 20 à 50°C, avec un optimum de 25 à 40°C), et les thermophiles (de 55 à 75°C).

Certains enzymes spécifiques fonctionnent dans des plages de température bien déterminées : l'activité enzymatique augmente avec une élévation de la température jusqu'à une valeur optimale. Au-delà de cette température commence le processus de dénaturation de l'enzyme et le taux de croissance diminue rapidement. La règle de Vant Hoff stipule que le taux de croissance des microorganismes double pour augmentation de 10°C jusqu'à la température optimale.

L'activité du consortium méthanogène est étroitement liée à la température. Deux plages de températures optimales peuvent être définies (Pohland 1992): mésophile (autour de 35°C) et thermophile (environ 55-60°C°).

I.1.4.4 pH

Pour la majorité des procédés biologiques anaérobies, les microorganismes peuvent croître dans une plage de pH de 4 à 9. Généralement, la croissance maximale des microorganismes se situe entre 6,5 et 7,3 (Ferry 1993). Un traitement biologique à un pH très bas (inférieur à 4) ou trop élevé (supérieur à 9) peut exercer une action inhibitrice sur les microorganismes. La variation de la croissance bactérienne est due au changement de l'activité enzymatique avec le pH. La concentration de l'ion hydrogène est considérée comme un des facteurs les plus influents sur l'activité enzymatique (Omil *et al.* 1997). Généralement, il est préférable d'ajuster le pH de l'effluent à traiter dans une plage optimale, afin de favoriser le traitement biologique des eaux usées. Il est alors recommandé d'utiliser un bassin d'égalisation en amont du traitement biologique afin de mieux contrôler les fluctuations de pH (Berne *et al.* 1989).

I.1.4.5 Concentration en nutriments

Le carbone, l'oxygène, l'azote, l'hydrogène et le phosphore représentent plus de 95% de la masse cellulaire. Ces éléments sont les nutriments qui doivent être présents dans les eaux usées pour permettre la croissance des micro-organismes. Des éléments traces sont aussi

nécessaires pour leur croissance : le potassium, le calcium, le cuivre, le molybdène, le cobalt, le vanadium, le magnésium, le fer, le manganèse, le zinc, le nickel, le sodium, le bore, le sélénium, l'argent, l'or, l'iode et le titane (Singh *et al.* 1999). Quelques-uns de ces micro-nutriments peuvent être contenus en partie dans les effluents à traiter. Leurs concentrations sont toutefois variables selon la source des eaux usées et du type de procédé utilisé.

La déficience en nutriments cause une limitation de la croissance bactérienne et affecte la performance du procédé d'épuration dans un système de traitement biologique. Le manque de nutriments peut aussi affecter l'écologie microbienne et changer la diversité des espèces de microorganismes (Henze *et al.* 1983).

À cause de la quantité importante de carbone à dégrader, l'azote et le phosphore sont souvent en quantité insuffisante dans les effluents industriels. Ce manque peut être résolu en ajoutant de façon contrôlée une solution de nutriments aux eaux usées à traiter. L'addition des macroéléments est généralement évaluée à partir du rendement en biomasse et de la formule brute décrivant la composition d'une cellule; le rapport C : N est le plus souvent utilisé pour chiffrer l'apport d'azote avec, comme convention, l'expression des ratios en proportion de la DCO. Des ratios DCO:N de 400 : 7 et 1000 : 7 ont ainsi été estimés comme nécessaires et suffisants pour des réacteurs conduits respectivement à forte et à faible charge volumique (Henze *et al.* 1983; Stronach *et al.* 1987). Le ratio N : P est évalué à 7 : 1 (Henze *et al.* 1983).

Des éléments minéraux sont également nécessaires sous forme de traces. Les plus importants sont le fer, le nickel, le magnésium, le calcium, le sodium et le cobalt, mais il est assez difficile d'évaluer avec précision le besoin de micro-organismes (Rajeshwari *et al.* 2000). Une déficience peut avoir de graves conséquences sur la stabilité et l'efficacité de la digestion anaérobie. L'ajout de cobalt et de nickel permet souvent d'augmenter de manière significative la production de méthane et l'acétogénèse (Florencio *et al.* 1993; Speece *et al.* 1983; Percheron *et al.* 1997; Zandvoort *et al.* 2003). Inversement, lorsque leurs teneurs dépassent certains seuils, les ions métalliques deviennent inhibiteurs. Il convient donc d'être extrêmement prudent lorsque l'on doit procéder à l'addition de ces composés afin d'améliorer les performances d'un procédé.

Ainsi, Speece (1983) a constaté un arrêt complet de la production de méthane pour une concentration en cuivre (Cu^{2+}) de 60 mg.L^{-1} . Le chrome (Cr^{3+}) produirait une inhibition de l'activité acétoclaste de 50% à 12 mg.L^{-1} (Soubes *et al.* 1994). Cobalt et nickel, à trop fortes doses, ont aussi un effet négatif: 70 mg.L^{-1} de Co^{2+} conduiraient à un arrêt de la méthanogénèse acétoclaste (Bhattacharya *et al.* 1995) et 120 mg.L^{-1} de Ni^{2+} réduiraient la production de biogaz de 50% dans le cas de granules (Fang et Hui 1994). Ces chiffres restent

purement indicatifs car ils dépendent de conditions expérimentales telles que la nature des boues ou du substrat.

Le Tableau I.5 propose quelques exemples de concentrations en Co^{2+} et en Ni^{2+} généralement rencontrées dans les milieux de cultures décrits dans la littérature.

Tableau I.5 : Quelques teneurs en cobalt et en nickel utilisées ou recommandées dans la littérature.

Co^{2+} (mg.L ⁻¹)	Ni^{2+} (mg.L ⁻¹)	Référence
44<	0,12	(Bhattacharya <i>et al.</i> 1995)
0,62	0,12	(Bhattacharya <i>et al.</i> 1996)
1,81	0,23	(Clancy <i>et al.</i> 1992)
0,05 – 3	0,05 - 2	(Demirel <i>et al.</i> 2004)
0,5 à 0,6		(Fox <i>et al.</i> 1996)
0,57	0,59	(Gupta <i>et al.</i> 1994)
0,04	0,01	(Harada <i>et al.</i> 1994)
1	1	(Kim <i>et al.</i> 2002)
1,98	16,72	(Li <i>et al.</i> 1996)
4,46	4,45	(Matsumoto <i>et al.</i> 1991)
0,586	0,421	(Moteleb <i>et al.</i> 2002)
0,62	0,12	(Parkin <i>et al.</i> 1990)
0,9	0,9	(Percheron <i>et al.</i> 1997)
0,89	0,25	(Ronnnow <i>et al.</i> 1982)
2,00	2,00	(Speece <i>et al.</i> 1983)

Les *Archaea* méthanogènes ont également besoin de sodium, inhibiteur entre 6 et 40 g.L⁻¹ (Hulshoff Pol *et al.* 1996), de potassium, de magnésium, de molybdène, de sélénium et de tungstène (Archer *et al.* 1990). Leur croissance nécessite évidemment de l'azote ammoniacal (NH_4^+), mais un excès réduit leurs performances lorsqu'elles ne sont pas acclimatées. La forme non ionisée NH_3 est toxique et les seuils de tolérance décrits dans la littérature couvrent une large gamme. Bhattacharya *et coll.* (1989) rapportent ainsi que certaines études observent un début d'effet à 700 mg N-total.L⁻¹ alors que d'autres (Singh 1999) montrent que des boues supportent des teneurs supérieures à 8000 mg N-total.L⁻¹.

I.1.5 Digestion anaérobie des effluents de l'industrie agroalimentaire

Les caractéristiques communes à toutes les eaux résiduaires de l'industrie alimentaire sont une pollution essentiellement organique et biodégradable, dépourvue de substances toxiques, dont la tendance générale à l'acidification et à la fermentation rapide en font des effluents facilement traitables par voie biologique (Moletta 2002). La caractérisation des effluents de l'industrie agroalimentaire permet de proposer des règles générales pour le choix de la technologie de traitement appropriée. Une première classification peut être établie à partir du secteur industriel : abattoir (bovin, porcin, volaille, ...), industrie laitière, brasseries,

industrie de l'amidon, industrie des fruits et légumes, industrie du sucre, distillerie, etc (Rajeshwari *et al.* 2000; Bernet *et al.*). Une autre classification repose sur les caractéristiques mêmes de l'effluent en terme de concentration en nutriments. On distingue :

- les effluents issus de la production végétale dont les exemples types sont les eaux usées issues des sucreries de betteraves, des amidonneries, des distilleries, des brasseries, de la production du vin, des conserveries de fruits et légumes qui sont pauvres en azote et en phosphore ;
- des effluents issus des procédés de transformation animale : abattoirs, laiteries, poissonneries, riches en azote (protéines) et phosphore (laiteries).

Les effluents issus de l'industrie agroalimentaire présentent une grande variabilité en température. Celle des effluents de laiterie varie ainsi de 3°C à 43°C et celle des effluents issus des brasseries de 18°C à 40°C (Austermann-Haun *et al.* 1997). De même, les débits peuvent varier beaucoup pour les industries agroalimentaires soumises à des productions saisonnières comme la transformation des fruits et légumes.

Les techniques anaérobies occupent une place très importante dans le traitement des eaux résiduaires issues des industries agroalimentaires, compte tenu de leur excellente biodégradabilité et de leurs fortes charges organiques. Ainsi, près des trois quarts des digesteurs fabriqués dans le monde traitent des effluents issus de la production alimentaire (Fruteau *et al.* 2004). Le Tableau I.6 répertorie pour chaque secteur industriel le nombre de procédés anaérobies construits à travers le monde pour le traitement des effluents de l'industrie agroalimentaire. Pour les deux tiers des 1222 procédés de traitements, il s'agit de procédés intensifs qui seront décrits dans au chapitre I.2. Concernant les secteurs industriels, les brasseries et malteries regroupent 23% des procédés de traitement en activité. Ce sont les industries de transformation des produits végétaux qui ont le plus recours à la digestion anaérobie pour le traitement de leurs effluents (Bernet *et al.* 2006).

Tableau I.6 : Nombre de digesteurs de taille industrielle pour le traitement des effluents des agroalimentaires dans le monde en janvier 2003 (Kleerebezem *et al.* 2003).

Type d'industrie	Type de réacteurs						Total
	Faible charge*	Contact anaérobie	Lits fixe	Lits mobiles	UASB	EGSB/IC	
Brasserie et malterie	2	-	6	4	185	88	285
Distillerie	25	31	40	-	76	9	181
Production de boissons	-	3	11	2	88	15	119
Sucrierie	-	49	7	1	32	3	92
Transformation de la pomme de terre	14	4	2		46	10	76
Laiterie, fromagerie	12	10	10	2	27	6	67
Amidonnerie	2	9	10	2	34		64
Levurerie	7	8	6		25	8	54
Confiserie	4	-	3		15	2	24
Production d'acide citrique	2	3	1	1	3	5	15
Brûlerie	-	-	7		4	1	12
Viticulture	-	-	6	1	3	1	11
Poissonnerie	1	4	-	-	2	1	8
Divers	10	22	40	5	112	25	214

* Réacteurs continus mélangés (CSTR) et lagunes anaérobies

Conclusion

Le processus de digestion anaérobie met en œuvre des consortiums microbiens complexes, constitués de plusieurs espèces en interaction les unes avec les autres, qu'il faut exploiter de façon optimale. Le principe du fonctionnement des réacteurs biologiques de dépollution par digestion anaérobie est ainsi basé sur l'exploitation de ce processus de transformation métabolique séquentiel effectué par ces différents groupes de microorganismes. Dans leur configuration de base, ils sont essentiellement employés pour l'élimination des composés carbonés présents sous forme soluble, pour lesquels les solutions par voie physico-chimique sont souvent peu efficaces ou très coûteuses ou difficiles à mettre en œuvre.

I.2 Les procédés anaérobies intensifs

Le terme réacteur à forte charge ou réacteur intensif peut être défini par les critères suivants : une charge organique volumique appliquée élevée et un temps de séjour hydraulique (TSH) court. Le taux de croissance de ces microorganismes étant relativement faible, il apparaît nécessaire de découpler le temps de rétention des microorganismes du temps de séjour hydraulique pour permettre leur croissance au sein des digesteurs, tout en minimisant le volume des réacteurs. Différentes approches ont été proposées :

- séparer et récupérer la biomasse libre lessivée pour la réintroduire dans le réacteur (procédés contact anaérobies, réacteurs de première génération), mais les charges volumiques restent limitées,
- contrôler le temps de rétention des solides en opérant les réacteurs de manière séquentielle discontinue (procédés séquentiels discontinus : « Sequencing Batch Reactor »),
- retenir la biomasse à l'intérieur du réacteur par un filtre membranaire (bioréacteur à membranes),
- distribuer et réguler l'apport hydraulique afin de permettre le développement et la rétention de biomasse en suspension au sein du réacteur sous la forme de granules ou de flocs denses possédant de bonnes propriétés de décantation, donc plus facilement retenus dans le réacteur,
- remplir le réacteur d'un support solide (particules, disques, films, plaques, etc...) à la surface duquel les microorganismes se développent sous la forme d'un biofilm.

Ces deux dernières approches sont basées sur la capacité naturelle des microorganismes à s'agréger entre eux et/ou à se fixer sur un support solide au sein d'une matrice de polymères biologiques. Elles permettent de s'affranchir des systèmes complexes de séparation tout en opérant en mode continu. Ainsi, l'augmentation de la concentration en biomasse engendre une meilleure efficacité de traitement. Les réacteurs anaérobies à forte charge ont démontré leur potentiel pour le traitement des effluents et sont aujourd'hui employés dans certains secteurs industriels. Une plus large utilisation passe cependant par un certain nombre d'améliorations :

- une tolérance accrue aux surcharges,
- un temps de démarrage et de redémarrage après une période d'arrêt plus court,
- une faible consommation d'énergie ou une meilleure valorisation de l'énergie produite,
- une bonne fiabilité du procédé,

- une large gamme d'effluents traitables,
- une opérabilité facilitée,
- un coût de fonctionnement et de construction réduit.

Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler les différents types de réacteurs à biomasse fixée : les réacteurs à lit fixe, à lit de boues et à lit mobile. Les réacteurs à lit fluidisé et expansé sont dits de troisième génération, tous les autres appartiennent à la deuxième génération de bioprocédés.

I.2.1 Types de réacteurs et procédés à biomasse fixée

I.2.1.1 Réacteurs à lit fixe

I.2.1.1.1 Réacteur à support fixe en vrac ou biofiltres anaérobies

Transposition aux procédés anaérobies des filtres bactériens aérobies déjà connus, le filtre anaérobie a été mis au point vers la fin des années soixante afin de pallier les difficultés de séparation des boues rencontrées avec le procédé contact anaérobie. Il s'agit d'un réacteur rempli avec un support particulaire au sein duquel la biomasse est retenue et alimentée en courant ascendant ou descendant. Le support représente une surface disponible pour la formation d'un film bactérien et diminue la turbulence du fluide, ce qui permet une sédimentation efficace de la biomasse restée en suspension (Young *et al.* 1982; van den Berg *et al.* 1985). L'utilisation d'un support d'une granulométrie faible peut également permettre une filtration efficace. Un des avantages principaux est que l'installation d'un clarificateur secondaire n'est pas nécessaire (Young *et al.* 1982). Au cours du fonctionnement, l'accumulation de biomasse entre les particules de support par effet filtrant est couplée à la formation d'un biofilm sur les particules. Ces deux phénomènes entraînent un colmatage progressif du filtre et la formation de chemins préférentiels pour l'effluent, ce qui induit une diminution des performances épuratoires (Young *et al.* 1982; van den Berg 1984). En fait, dans un tel système, moins de 50 % des cellules sont fixées et la majorité d'entre elles se retrouvent sous forme de floes piégés entre les interstices du support (Young *et al.* 1982; Weiland *et al.* 1988). Les floes, au regard de leurs propriétés de sédimentation, s'accumulent dans la partie inférieure du réacteur où se concentre la majeure partie de l'activité biologique. Cette capture améliorée de la biomasse permet d'obtenir des temps de résidence des solides de l'ordre de 100 jours et d'appliquer des TSH de 10 à 50 heures, correspondant à des charges organiques maximales de 10-16 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ (Young *et al.* 1982; Young *et al.* 1989; Wheatley 1990).

L'élimination des surplus de biomasse pour éviter le colmatage est difficile à mettre en œuvre étant donné que le garnissage rend les purges peu efficaces. L'application d'un flux descendant a permis de réduire ce problème majeur (van den Berg 1984). La recirculation du biogaz permet également de déloger la biomasse et de l'éliminer avec le flux d'eau.

Un autre inconvénient des biofiltres réside dans le régime hydraulique piston du réacteur qui peut engendrer la formation des chemins d'écoulements préférentiels si la distribution de l'effluent à la base du filtre n'est pas répartie de manière homogène (Wheatley 1990).

Ce type de réacteur paraît donc adapté pour le traitement d'effluents contenant peu de matières en suspension. La conception simple du réacteur, la rapidité de démarrage du système, la tolérance aux variations de concentration et de température de l'effluent à traiter, la possibilité d'adopter un aspect modulaire qui facilite l'adaptation aux variations de charge, l'absence de mélange mécanique sont les principaux avantages du procédé de biofiltration (Tay *et al.* 1996).

1.2.1.1.2 Réacteurs à support fixé orienté/ organisé

Développé dans les années 70 par l'équipe de van den Berg (van den Berg *et al.* 1979; van den Berg *et al.* 1985) afin de résoudre les problèmes de colmatage rencontrés avec les biofiltres, ce type de réacteur peut fonctionner en mode ascendant ou descendant. En mode descendant, la circulation à contre courant de l'effluent liquide et du gaz (produit au niveau du biofilm) permet une meilleure distribution de l'effluent (van den Berg *et al.* 1979). Les risques de colmatage sont réduits par l'utilisation de supports présentant des taux de vide importants, permettant le lessivage des particules en suspension. La biomasse est ainsi entièrement fixée sur le support du réacteur sous la forme d'un biofilm, et il n'y a pas ou très peu de biomasse en suspension.

Ce type de procédé maintient cependant un rapport surface disponible / volume de réacteur élevé (van den Berg *et al.* 1979; Weiland *et al.* 1988). L'épaisseur du biofilm, qui peut atteindre 1 à 4 mm, est limitée par la diffusion. Il faut toutefois ne pas sacrifier le coefficient de vide car un risque de colmatage n'est pas complètement éliminé (van den Berg *et al.* 1979). Le comportement hydraulique du réacteur de type parfaitement mélangé favorise les transferts de matière comparativement au filtre anaérobie (Weiland *et al.* 1988).

Une recirculation périodique du gaz et de l'effluent à contre courant permet de décolmater le support et de contrôler la quantité de biomasse présente dans le réacteur. De nombreux digesteurs industriels de ce type sont actuellement en activité pour le traitement d'effluents de distilleries, de laiteries, de fromageries, de raffineries de sucre de betterave et de canne, de

conserveries, de fabriques de confiture, de porcheries et d'industries chimiques (Camilleri 1988; Henry *et al.* 1988; Disetti).

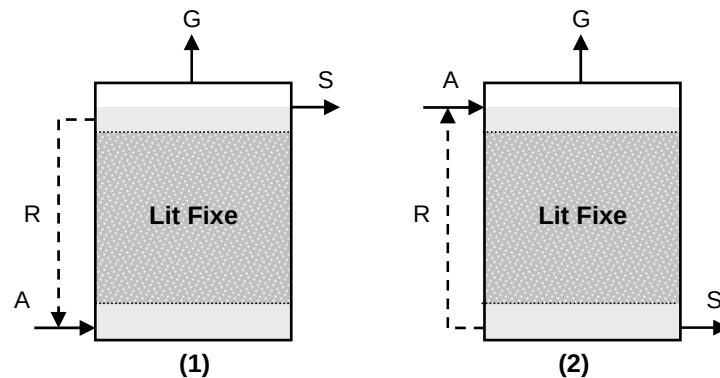


Figure I.5 : Différentes configurations des réacteurs à lit fixe, (1) flux ascendant, (2) flux descendant.
G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation

I.2.1.2 Les réacteurs à lit de boues

I.2.1.2.1 Réacteur à flux ascendant (UASB)

Développé par Gätze Lettinga et ses collaborateurs dès la fin des années 1970, le réacteur à lit de boues (UASB pour Upflow Anaerobic Sludge Blanket) est un réacteur sans garnissage, alimenté en flux ascendant et équipé à sa partie supérieure d'un système de séparation gaz-liquide-solide (Lettinga *et al.* 1980). Ce système permet l'évacuation du biogaz et limite la sortie des matières en suspension. Son comportement hydraulique est de type parfaitement mélangé excepté au niveau du séparateur gaz-liquide-solide qui présente les caractéristiques hydrauliques d'un réacteur piston (Heertjes *et al.* 1978). L'agitation du milieu est principalement due à la production de biogaz. Une bonne distribution de l'effluent est nécessaire, en particulier pour les eaux usées faiblement concentrées en DCO qui génèrent peu de gaz, ceci afin d'éviter la formation de chemins préférentiels (Lettinga *et al.* 1990).

La rétention de la biomasse dans les réacteurs à lit de boues est basée sur la capacité des microorganismes anaérobies à flocculer pour former des granules qui peuvent atteindre jusqu'à 5 mm de diamètre et qui présentent de bonnes caractéristiques de sédimentation (indice volumique $< 20 \text{ ml.g}^{-1} \text{ MVS}$; vitesse maximale de sédimentation $> 5 \text{ m.h}^{-1}$), et une bonne résistance mécanique. Ceci évite leur lessivage du réacteur dans lequel la vitesse ascensionnelle du liquide est généralement maintenue entre 1 et $1,5 \text{ m.h}^{-1}$ (Seghezzo *et al.* 1998; Hulshoff Pol *et al.* 2004; Show *et al.* 2004).

Le principal problème réside dans la formation et le maintien des granules. La granulation est un phénomène lent qui entraîne une longue période de démarrage (environ 6

mois) si des boues de digesteurs non adaptées sont employées comme inoculum. La formation d'une boue granulaire est pratiquement impossible avec certains types d'effluents et une dégranulation peut être observée lorsque le réacteur qui traite ces effluents est ensemencé avec une boue déjà granulaire (Lettinga *et al.* 1980; Seghezze *et al.* 1998).

Les procédés à lit de boues sont également sensibles à la concentration de l'effluent en matières en suspension : en effet, une faible vitesse ascensionnelle ne permet pas le lessivage des matières particulaires, ce qui peut provoquer leur accumulation aux dépends de la formation de granules, entraînant ainsi une diminution de l'activité biologique (Seghezze *et al.* 1998). La résolution de ces problèmes passe par une meilleure connaissance des mécanismes intimes de la granulation et des facteurs qui la gouvernent. Les granules sont constituées exclusivement de microorganismes (Dolfing 1985). Il est généralement admis que leur formation est le résultat de la sélection de bactéries floculantes dans un système à flux ascendant où les cellules libres en suspension sont forcément lessivées (Lettinga *et al.* 1983).

Les granules présentent en outre une organisation bactérienne très complexe. Les microorganismes fermentaires, syntrophes et méthanogènes y sont étroitement associés les uns aux autres, ce qui réduit la distance qui les sépare. Le transfert inter espèces d'hydrogène et la diffusion des métabolites le long de la chaîne trophique en sont plus efficaces (Dubourguier *et al.* 1988; Thiele 1991; Pauss *et al.* 1993). Après une analyse des différents modèles de formation de granules existant, Liu *et al.* (2003) proposent un modèle général en quatre étapes. D'une manière générale, les modèles de formation des granules s'apparentent à ceux décrits pour la formation du biofilm au chapitre I.3, et les forces et les interactions mises en jeu sont celles qui prédominent pour chacune des étapes de la formation du biofilm. On peut cependant identifier un certain nombre de facteurs qui influencent la granulation :

- La nature des composés organiques à dégrader : les effluents qui contiennent des sucres, des protéines et des acides gras volatils semblent adaptés à la formation de granules. Dans le cas des acides gras volatils, les granules sont de plus petite taille mais conservent toutefois des indices volumiques adéquats. La granulation semble par contre impossible ou difficile à obtenir en présence de lipides et lorsque les matières en suspension sont abondantes. Les lipides entraînent la flottation des boues et les MES servent de support à l'attachement des bactéries qui n'ont plus tendance à floculer (Lettinga *et al.* 1990) ;
- La présence de certains composés minéraux tels que Ca, Fe, Ni, Co, Mn, FeS a un effet positif sur la croissance des granules. Le Ca^{2+} et le FeS pourraient servir de noyau initial à

la formation des granules. Les autres métaux à l'état de trace stimuleraient simplement la croissance des microorganismes (Goodwin *et al.* 1990; Grotenhuis *et al.* 1991; Yu *et al.* 2001) ;

- Les contraintes hydrodynamiques, qui ont un impact prépondérant lors des phases initiales de la granulation et qui jouent également un rôle important lors de la croissance sur la structure et les propriétés physiques des granules (Liu *et al.* 2003) ;
- La vitesse ascensionnelle du fluide, qui permet la sélection des microorganismes formant des granules, qui conditionne leur taille et leur structure (des granules de 1 à 3 mm de diamètre sont obtenus pour des vitesses ascensionnelles de 1 à 2 m.h⁻¹), et qui peut entraîner une érosion des particules et une diminution de leur diamètre lorsqu'elle est trop élevée (vitesse supérieure à 2 m.h⁻¹) (Liu *et al.* 2002) ;
- La concentration en matière organique. La taille des granules augmente avec la DCO de l'effluent (Grotenhuis *et al.* 1991) ;
- La synthèse de polymères extracellulaires (EPS) par les bactéries. Ils permettent l'adhésion de cellules entre elles (Dolfing 1985; El-Mamouni *et al.* 1998) ;
- Les interactions physico-chimiques de faible énergie de type Van der Waals, dipôle-dipôles, ioniques, hydrophobes, gravitaires ; les forces thermodynamique (mouvements browniens), qui jouent un rôle prépondérant lors des phénomènes initiaux de granulation (Hulshoff Pol *et al.* 2004) ;
- Les phénomènes de communication intercellulaire (signalisation intercellulaire, quorum sensing), et de fusion membranaire (Liu *et al.* 2003) ;
- La présence de certains types de microorganismes : les bactéries filamenteuses servent de pont entre les cellules (Liu *et al.* 2003), la présence d'*Archaea* méthanogènes acétotrophes semble également jouer un rôle important lors du phénomène de granulation ;
- L'accessibilité au substrat et les phénomènes de diffusion qui vont dicter l'organisation spatiale des différents groupes trophiques de granules anaérobies (Hulshoff Pol *et al.* 2004) ;
- L'ajout de composés favorisant la granulation, notamment les polymères cationiques (Show *et al.* 2004; Tiwaria *et al.* 2005).

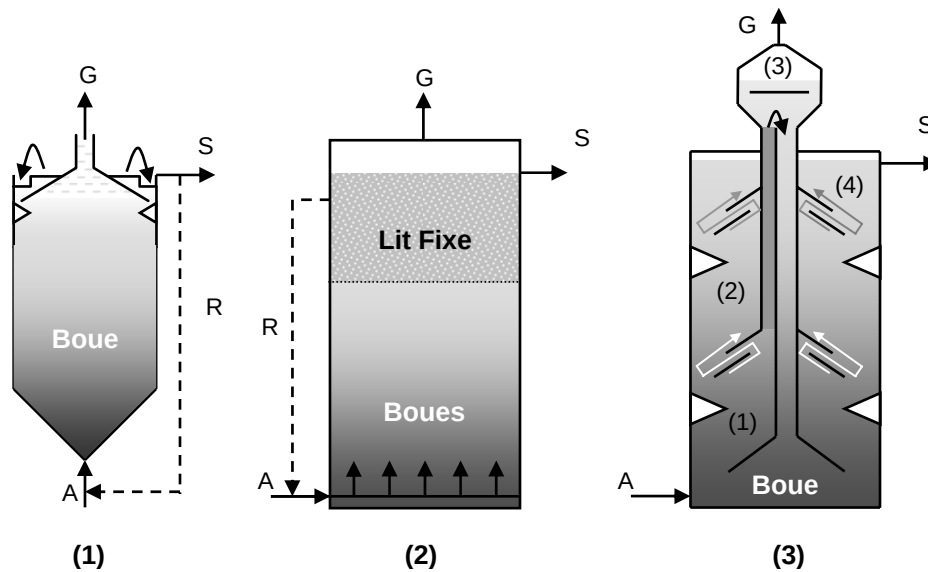


Figure I.6 : Schéma de principe d'un réacteur à lit de boues (1) à flux ascendant (UASB : Up-flow Anaerobic Sludge Blanket), (2) Hybride, (3) à circulation interne (IC). G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation

Les évolutions apportées à l'UASB depuis son invention sont nombreuses. Ainsi, certains chercheurs ont remplacé le séparateur gaz-solide en haut du réacteur par un lit fixe ascendant (UASB-FA). D'autres équipes ont adapté les conditions de fluidisation d'un lit fluidisé (vitesses de liquide et de gaz) aux lits de boues pour obtenir l'expansion des granules et traiter divers rejets chimiques, biochimiques, biotechnologiques à forte charge (Nicolella *et al.* 2000). Ce réacteur est communément appelé EGSB (Expanded Granular Sludge Blanket) et peut traiter des charges plus importantes. La compartimentation de l'espace du réacteur a conduit au réacteur à circulation interne (IC pour Internal Circulation), qui consiste en deux réacteurs UASB superposés. Le réacteur inférieur fonctionne à forte charge et le biogaz produit est récupéré pour la fluidisation du second réacteur situé au-dessus et alimenté à faible charge (Nicolella *et al.* 2000).

I.2.1.2.2 Réacteur compartimenté

Conçu dans les années 1980 par l'équipe de McCarty (Bachmann *et al.* 1985; McCarty *et al.* 1987), deux configurations sont possibles : soit un réacteur horizontal équipé de séparations verticales, qui délimitent un certain nombre de compartiments successifs sur toute la longueur du digesteur, soit une configuration verticale, on parle alors de réacteur à plateaux (Law *et al.* 2004). L'enceinte réactionnelle est ainsi séparée en plusieurs réacteurs à lit de boues successifs et la biomasse piégée entre les différents compartiments prend la forme de granules, comme dans le réacteur UASB. Le courant d'eau est alternativement montant et

descendant d'un compartiment à l'autre, et l'architecture du digesteur permet d'obtenir un courant majoritairement montant au niveau du lit de boue.

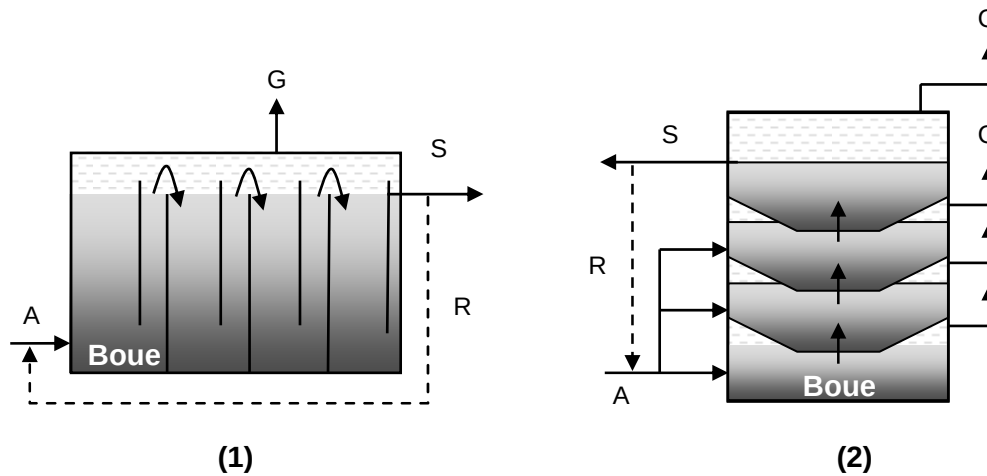


Figure I.7 : Schéma de principe d'un réacteur à lit de boues compartimenté horizontal (1), compartimenté vertical ou à plateau (2). G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation

La séparation de la biomasse en plusieurs compartiments permet la sélection de populations bactériennes différentes le long du réacteur. L'espace réactionnel peut alors être assimilé à un système à 2 phases pour la digestion anaérobie avec l'acidogenèse dans les premiers compartiments et la méthanogenèse en fin de réacteur. Cette configuration assurerait une meilleure stabilité vis à vis de perturbations environnementales (Barber *et al.* 1999). Xiushan *et al.* (1988) ont montré par exemple que le premier compartiment d'un réacteur compartimenté traitant des effluents contenant beaucoup d'acétate renfermait des granules présentant à leur surface principalement des colonies de *Methanosarcina*, alors que dans les autres compartiments, les bactéries du genre *Methanothrix* étaient majoritaires (Barber *et al.* 1999). Cette organisation bactérienne devrait permettre au système de mieux résister au choc de charge. Parmi les avantages de cette technologie, la transposition spatiale des réactions temporelles du processus de méthanisation est considérée comme très intéressante. Cependant, les TSH faibles (20 heures) engendrent la formation de chemins préférentiels et sont accompagnés d'un lessivage important de la biomasse (Barber *et al.* 1998).

1.2.1.3 Le réacteur à lit expansé ou fluidisé

Ce type de réacteurs appartient à la dernière génération des digesteurs à biomasse fixée. Les microorganismes sont immobilisés sur un support constitué de fines particules granulaires inertes (0,1-1 mm de diamètre). Le support est mis en suspension (fluidisé) par un courant de liquide, ascendant (lit fluidisé ascendant, LFA) ou descendant (lit fluidisé

descendant, LFD), en fonction de la densité du support (van den Berg 1986; Iza *et al.* 1988; Wheatley 1990). Si le lit de particules n'est expansé que de 20 à 30% (vitesses proches du minimum de fluidisation), on parle de réacteur à lit expansé. Si le taux d'expansion est supérieur à 30%, on parle de lit fluidisé (Laguérie *et al.* 1991). L'avantage majeur des lits fluidisés provient de la mobilité des particules qui permet d'assurer un bon mélange du milieu réactionnel et réduit les possibilités de colmatage (Roustan *et al.* 1993). Les unités sont en outre construites en hauteur avec un faible diamètre de façon à maximiser les vitesses ascensionnelles du liquide (8-10 m.h⁻¹), par conséquent leur encombrement au sol est réduit. La nécessité d'une recirculation de l'effluent afin d'atteindre les vitesses de fluidisation se traduit néanmoins par un coût supplémentaire (Shimodaira *et al.* 1983; Nicoletta *et al.* 2000). Le réacteur à lit fluidisé est un système plus complexe que ses concurrents, et sa conduite ainsi que son démarrage sont considérés comme extrêmement délicats. Une meilleure opérabilité de ce type de procédé est liée au développement de systèmes de contrôles automatiques qui permettent d'effectuer un suivi en temps réel de la fermentation et de répondre rapidement et de manière appropriée aux signes de déstabilisation (Steyer *et al.* 1999).

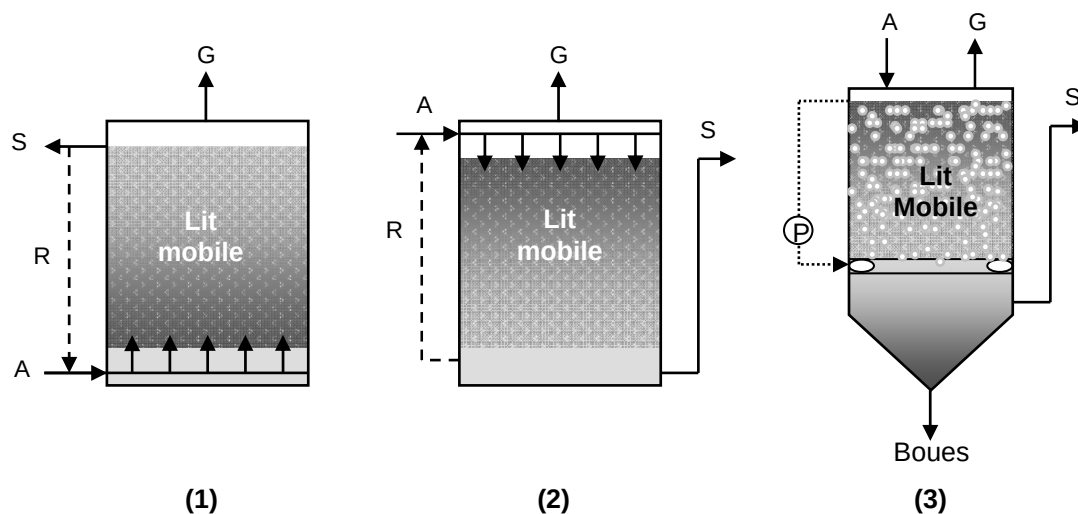


Figure I.8 : Schéma de principe d'un réacteur à lit fluidisé (1) à flux ascendant, (2) à flux descendant, (3) à lit turbulent inverse. G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation du liquide. P : pompe de recirculation du gaz.

Les concentrations en biomasse dans le réacteur à support particulaire mobile se situent couramment entre 15 et 30 g.L⁻¹ (Elmaleh *et al.* 1984; Chen *et al.* 1988) et peuvent atteindre 50 g.L⁻¹ (van Loosdrecht *et al.* 1993). Cette caractéristique laisse envisager la possibilité de traiter efficacement, des charges organiques très élevées (Lettinga 2005).

Un problème majeur est la rétention du support colonisé au cours de l'opération. En effet, la vitesse de fluidisation permettant un taux d'expansion du lit constant doit être adaptée à la variation de taille et de densité du support, afin de maintenir les particules les plus lourdes (les moins colonisées) en fluidisation, tout en évitant de perdre les particules les plus légères (les plus colonisées) : Diez Blanco *et al.* (1995) ont dû appliquer une baisse de 22% de la vitesse de recirculation liquide pour conserver la fluidisation de l'ensemble des particules vierges et colonisées. Ce paramètre est cependant difficile à maîtriser.

Une autre caractéristique des lits fluidisés ascendants concerne la formation d'un lit de boues en haut du réacteur (Garcia-Encina *et al.* 1987). Il peut représenter jusqu'à 70% de la biomasse active du réacteur et présenter un risque de désagrégation non contrôlable (Fox *et al.* 1990). Cependant, certains auteurs (Coma *et al.* 1990) rappellent l'utilité d'une floculation en haut d'un lit fluidisé, équipé d'un décanteur multitubulaire, sur l'élimination des matières en suspension.

En outre, l'absence d'un contrôle actif de la taille du biofilm est un inconvénient général à tous les réacteurs à lit fluidisé. Il conduit généralement à une surproduction de biomasse attachée, ce qui entraîne une baisse de l'activité spécifique et des problèmes liés au colmatage du lit ou à l'agglomération de bioparticules. Des études sur l'influence de l'introduction de gaz dans un réacteur à lit fluidisé ont mis en évidence son rôle actif dans le contrôle de l'épaisseur du biofilm. Trinet *et al.* (1991) ont développé un biofilm dense et actif d'épaisseur inférieure à 20 μm grâce à l'injection de gaz au pied du réacteur

Heijnen *et al.* (1992) montrent que dans le cas d'un réacteur à forte turbulence avec un support de petite taille, l'augmentation de la biomasse est principalement causée par une élévation du nombre de particules couvertes et moins par une augmentation graduelle de l'épaisseur. De plus, dans les réacteurs soumis à de fortes contraintes hydrodynamiques, le détachement du biofilm est compensé par la croissance et contribuerait au maintien d'une biomasse fixée stable dans le réacteur (van Loosdrecht *et al.* 1993).

Le fonctionnement intensif à des charges volumiques élevées entraîne des problèmes hydrodynamiques liés à la production importante de biogaz et à une forte colonisation du support qui modifie la densité des particules. La colonisation du support n'est pas identique pour toutes les particules. Cela se traduit par une stratification des bioparticules sur toute la hauteur du lit avec les particules vierges en bas du réacteur et les particules les plus colonisées en haut. Ce phénomène modifie les conditions hydrodynamiques à appliquer afin d'obtenir un fonctionnement continu du bioréacteur (Myska *et al.* 1994) sans risquer le lessivage.

Afin de limiter le lessivage des bioparticules tout en augmentant leur taille et la quantité de biomasse retenue, certains chercheurs, tels Huang *et al.* (2000), proposent une configuration en cône du réacteur. Ils améliorent ainsi les performances par rapport aux procédés LF classiques mais ne résolvent pas le problème de la stratification des particules dans le lit.

La direction concourante des flux de liquide et de gaz qui caractérise le système ascendant peut également engendrer des problèmes de contraction initiale ou tassement du lit, qui réduisent considérablement le temps de contact entre la phase liquide et la biomasse. Dans le cas de Buffière *et al.* (1998b), cette réduction atteint 15%. De plus, ce type d'écoulement favorise le détachement intempestif de biofilm en raison des phénomènes de bullage par à-coups. Pour pallier ce type de problèmes des lits fluidisés descendants anaérobies ont été mis en œuvre (Meraz *et al.* 1996; García-Calderón 1997; Arnaiz *et al.* 2003). Le principe de fonctionnement réside dans l'utilisation de particules flottantes fluidisées par un courant de liquide descendant. Les avantages de ce procédé sont nombreux. En ce qui concerne la fluidisation, l'énergie nécessaire est plus faible et elle est favorisée par l'écoulement du biogaz à contre courant du liquide. Toutefois, ces réacteurs connaissent également des problèmes de colmatage sur la boucle de recirculation liquide, ainsi qu'une difficulté dans la répartition du liquide sur toute la section du réacteur à l'échelle industrielle (García-Calderón 1997).

1.2.1.4 Le réacteur à lit turbulent inverse

Le réacteur à lit turbulent inverse (LTI) utilise du gaz pour fluidiser des particules de masse volumique inférieure à celle de l'eau ($\rho_s - \rho_{\text{eau}} \approx 30$ à 200 g.L^{-1}). A partir d'un certain débit de gaz, le solide se répartit tout au long de la colonne (Roustan *et al.* 1995). Le gaz injecté à la base du réacteur assure seul la fluidisation du support, ce qui la rend totalement indépendante du débit d'alimentation liquide. La hauteur du lit est parfaitement contrôlée et stable puisque les particules flottantes ne descendent pas en dessous de la zone d'injection du gaz, à l'exception des particules trop colonisées qui peuvent alors être facilement récupérées au fond du réacteur par décantation (Buffière *et al.* 2000a). La mise en mouvement du solide par le gaz est le résultat de deux phénomènes (Comte *et al.* 1997) :

- La pseudo-fluidisation. La diminution de la densité du mélange liquide-gaz considérée comme une pseudo-phase va favoriser la décantation des particules et entraîner un gradient axial de concentration en solide. La distribution du solide est homogène lorsque la masse volumique du pseudo-fluide est égale à celle du solide. Dans le cas de l'extendsphère, c'est le mélange liquide-solide qui est le pseudo-fluide (Sanchez *et al.* 2005) ;

- Les circulations liquides générées par l'ascension des bulles participent également à la mise en mouvement du support. En effet, les bulles, générées par le distributeur, montent dans la colonne et sont suivies d'un sillage liquide. Il se crée des courants de liquide ascendants mais également des courants descendants dans les zones pauvres en bulles (parois de la colonne).

Ces deux phénomènes coexistent et sont responsables de la fluidisation. En effet, des résultats ont montré que la fluidisation homogène (gradient de solide proche de zéro sur la hauteur du lit) est observée pour des vitesses de gaz (U_g) et des rétentions gazeuses bien inférieures à celles qui entraînent une densité du pseudo-fluide (liquide-gaz) égale à celle du solide. Les mouvements de liquide induits par la remontée des bulles de gaz sont alors également responsables de la fluidisation des particules. Buffière et Michaud (Buffière *et al.* 1999; Michaud 2001) ont montré qu'avec un support d'une taille de l'ordre du millimètre et une densité proche de celle de l'eau et d'autre part un solide d'une taille de l'ordre de 0,1 mm et de densité très faible ($\cong 0,7$), une fluidisation homogène, avec un gradient de solide proche de zéro, est observée pour une vitesse de gaz U_g bien inférieure à celle qui entraîne une densité du pseudo-fluide (liquide-gaz) égale à celle du solide.

Comte *et al.* (1998) ont également mis en évidence l'influence du solide sur le mélange de la phase liquide ainsi que sur la rétention gazeuse. Le degré de mélange de la phase liquide induit par la circulation des bulles de gaz augmente avec la vitesse gazeuse et est fortement conditionné par le type de distributeur. En régime de bulles homogènes, à des vitesses de gaz supérieures au minimum de fluidisation, le comportement hydraulique du LTI est de type parfaitement mélangé (Michaud 2001; Sanchez *et al.* 2005).

Les collisions entre les particules sont responsables de l'abrasion qui représente la cause majeure du détachement du biofilm. Dans le cas des réacteurs à forte intensité de mélange (Trinet *et al.* 1991). Buffière *et al.* (2000) ont étudié le phénomène d'attrition dans un LTI à l'aide d'un hydrophone qui permet d'enregistrer les grandeurs caractéristiques des collisions des particules sur une sonde : fréquence de collisions, vitesse d'impact et pression moyenne des particules. La vitesse du gaz qui met en mouvement le support possède un impact positif significatif sur la fréquence de collision et la pression moyenne des particules. La concentration en solide a également une action significative sur les caractéristiques de l'attrition. Pour un système dilué (faible concentration en solide), la pression moyenne de

collision des particules est faible : les particules sont " libres " de mouvement mais peu de particules entrent en contact avec la sonde (faible fréquence de collision). D'un autre côté, pour de fortes concentrations en particules, la fréquence de collision est plus grande, mais les vitesses de collision sont plus faibles : la pression moyenne de collision est également faible. Par contre, pour des valeurs intermédiaires (concentration volumique en solide de l'ordre de 30 à 35%), cette grandeur passe par un maximum car les vitesses de collision sont plus importantes que dans le cas de fortes concentrations et la fréquence de collision est plus grande que dans le cas dilué.

L'attrition est directement corrélée à un détachement important du biofilm et donc à un meilleur contrôle de la taille des bioparticules (Buffière *et al.* 1999). Vieira et Melo (1999) signalent que les biofilms formés dans des contraintes d'attrition importantes en flux turbulents permettent d'assurer la robustesse du réacteur.

En outre, contrairement aux procédés ascendants classiques, la vitesse de fluidisation pour avoir une distribution homogène du support dans le LTI diminue avec l'augmentation de la concentration de solide (Comte *et al.* 1997). Ainsi, ce procédé peut fonctionner avec plus de support, en offrant donc une surface de colonisation potentielle plus importante, tout en réduisant les coûts énergétiques pour sa fluidisation.

I.2.2 Performances des procédés anaérobies à biomasse fixée

I.2.2.1 Rétention de biomasse

L'efficacité d'un procédé de traitement anaérobie dépend de la quantité de biomasse active au sein du réacteur. L'accumulation et la rétention d'une quantité maximale de microorganismes anaérobies sont donc des paramètres clés du design des réacteurs. Si les microorganismes responsables de l'épuration sont lessivés hors du réacteur ou si leur taux de mortalité dépasse leur taux de renouvellement, les performances du procédé seront diminuées (Weiland *et al.* 1991). La Figure I.9 propose une comparaison de la gamme de concentrations en biomasse présentes dans différents types de réacteurs.

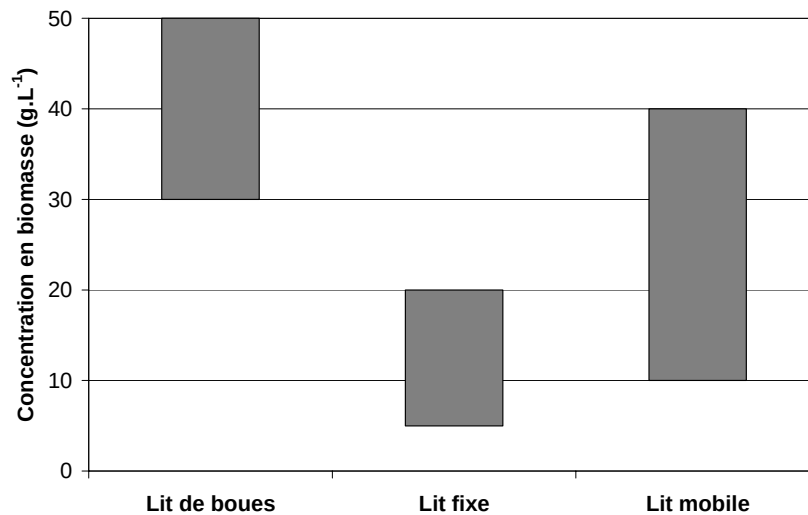


Figure I.9 : Concentrations en biomasse en fonction de différents types de réacteurs (Weiland *et al.* 1991)

La quantité de biomasse n'est cependant pas toujours compatible avec une meilleure activité. Ainsi, l'accumulation de biomasse attachée peut avoir lieu au détriment de l'activité spécifique. Une grande rétention de biomasse engendre des problèmes de diffusion et d'accès aux substrats. Austermann-Haun *et al.* (1994) soulignent cette différence fondamentale entre quantité et activité biologique. Les notions de sélection et d'arrangement des flores bactériennes dans le biofilm ont autant d'importance que l'accumulation de biomasse. D'autre part, l'accumulation d'une quantité excessive de biomasse peut entraîner des dysfonctionnements et aboutir à la faillite du système (Iwai *et al.* 1994). La difficulté de contrôler efficacement la quantité de biomasse à l'intérieur du réacteur constitue donc une des problématiques majeures des procédés de traitement biologique à biomasse fixée.

1.2.2.2 Accès au substrat

Dans un réacteur de digestion anaérobie, la matière organique peut être sous forme soluble ou colloïdale. Lors du processus de biodégradation, un substrat soluble entre en contact avec la surface du biofilm et est transporté à l'intérieur par diffusion moléculaire. Ainsi, cette substance au contact avec la membrane cellulaire peut pénétrer directement dans la cellule et être métabolisée (Larsen *et al.* 1994). Par contre, un substrat colloïdal doit subir des modifications de structure avant son passage à travers le biofilm. Il est tout d'abord adsorbé à la surface du biofilm, pour être hydrolysé par des enzymes extracellulaires en de plus petites molécules qui peuvent diffuser à travers le biofilm et être métabolisées par les

microorganismes (Iwai *et al.* 1994). Les produits finaux du métabolisme sont transférés vers la phase liquide en sens inverse des substrats.

Parce que le biofilm a une structure polymérique plus ou moins dense, on lui attribue souvent un rôle de barrière de diffusion aux transports de matière (nutriments, gaz, cellules, etc). Une limitation du transfert de matière crée un micro-environnement autour des cellules affectant la diffusion de nutriments vers la cellule mais aussi l'élimination des produits (Kennedy *et al.* 1987). Ainsi, les principaux groupes de bactéries composant la chaîne trophique de la digestion anaérobie qui développent des interactions de type syntrophique vont croître préférentiellement regroupés dans l'espace sous la forme d'agrégats, ceci afin de faciliter les transferts de matière inter-spécifiques (Kennedy *et al.* 1987; Batstone *et al.* 2004). Les conditions hydrodynamiques, la qualité du macromélange, la production et l'excrétion de substances extracellulaires affectent la résistance à la diffusion.

En ce qui concerne les réacteurs fluidisés ou turbulés, l'utilisation de supports particuliers présentant une grande surface spécifique permet la fixation d'une biomasse plus abondante et représente une surface d'échange liquide-solide plus élevée qui, combinée au caractère hydraulique parfaitement mélangé du réacteur, améliore considérablement le contact entre les cellules et leur substrat (Buffiere *et al.* 1998a).

I.2.2.3 Performances épuratoires

Les Figure I.10 et Figure I.11 permettent de comparer les régimes de fonctionnement des procédés à biomasse fixée : filtres anaérobies, lits fixes à support organisé, lits de boue, lits mobiles.

Les **filtres anaérobies** peuvent être utilisés pour traiter des effluents de concentration faible (proches de $1 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$) ou moyenne ($\text{DCO} < 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Pour des effluents plus chargés, un recyclage doit être mis en place afin d'assurer une DCO dans le réacteur entre 8 et $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Les charges organiques maximales traitées par ce type de réacteurs dépassent les $40 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ avec des temps de séjour situés entre 10 et 50 heures (van den Berg *et al.* 1985).

Le régime piston permet toutefois au filtre anaérobie de bien résister aux chocs de charge. Young et Dahab (1982) rapportent qu'un filtre soumis à des chocs de charge équivalents à 4 fois la charge nominale appliquée récupère un état stationnaire en l'espace de quelques heures après être retourné aux conditions initiales d'alimentation. Ce type de réacteur présente donc une robustesse ainsi qu'un recouvrement rapide d'activité après une longue période d'arrêt (Rajeshwari *et al.* 2000). Ces procédés sont particulièrement adaptés au traitement de rejets liquides pauvres en matières en suspension.

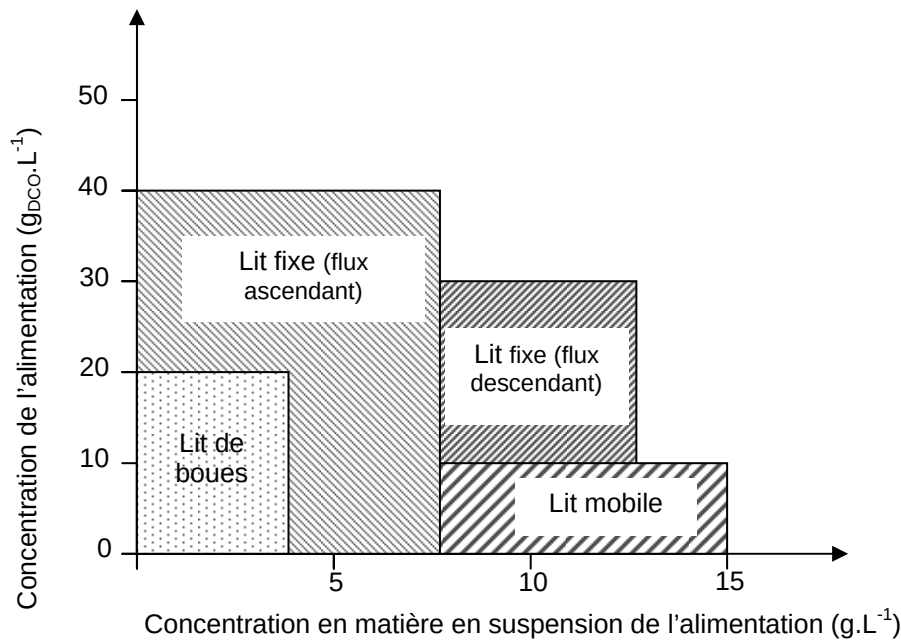


Figure I.10 : Régimes de fonctionnement classiquement appliqués aux procédés à fortes charges en fonction de la charge organique de l'effluent et de la concentration en matières en suspension

Les procédés à support organisé peuvent supporter des charges allant jusqu'à 30 $\text{g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Ils peuvent traiter des effluents relativement dilués ($4 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}$) ainsi que pour des effluents concentrés ($40 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}$) (Weiland *et al.* 1991). Ils s'accommodent de la présence de matières en suspension présentes par exemple dans les eaux usées agro-industrielles, et le temps de séjour hydraulique doit cependant être ajusté à leur cinétique d'hydrolyse (van den berg, 1984). Le réacteur résiste également bien aux chocs de charge, à une alimentation discontinue, ou à un arrêt prolongé d'alimentation pendant plusieurs mois (van den Berg 1986; Camilleri 1988).

Les réacteurs à lits de boue (UASB, EGSB, IC...) peuvent traiter des charges pouvant aller jusqu'à $40 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et acceptent des TSH de quelques heures à quelques jours suivant la nature de l'effluent à traiter (Lettinga *et al.* 1990; Hulshoff Pol *et al.* 2004). La charge communément appliquée à ce type de réacteur est de $24 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (Nicolella *et al.* 2000). La présence d'une quantité importante de matières en suspension dans l'effluent à traiter peut entraîner des problèmes sérieux tels que la baisse de l'activité spécifique, la formation de mousse ou encore un ralentissement de la croissance des granules. Ces problèmes peuvent devenir irréversibles, en particulier lorsque l'accumulation de solide se fait de façon prolongée car elle conduit alors au lessivage complet du lit de boues (Lettinga *et al.* 1990).

Le manque de maîtrise de la taille et de la densité des granules est un autre inconvénient à signaler (Weiland *et al.* 1991). Le fonctionnement des réacteurs à lits de boue est restreint par des contraintes de fonctionnement hydraulique puisque, sous peine de lessiver la biomasse granulaire, la vitesse ascensionnelle du liquide ne doit pas dépasser $1,5 \text{ m.h}^{-1}$. Ainsi, les temps de rétention hydraulique minimums applicables sont de l'ordre de 4 à 6 heures. Les réacteurs à lits de boue sont donc adaptés au traitement d'effluents faiblement ou moyennement chargés (Weiland *et al.* 1991).

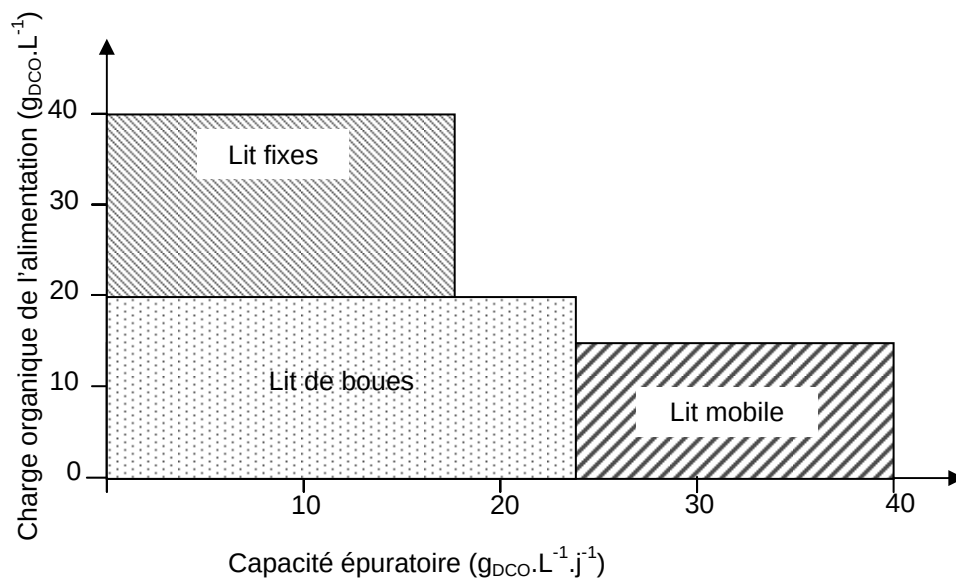


Figure I.11 : Régimes de fonctionnement classiquement appliqués aux procédés à fortes charges : charge organique de l'effluent et capacité épuratoire

De par sa grande capacité de rétention de biomasse, **le réacteur à lit fluidisé** est d'une manière générale plus efficace que les filtres anaérobies mais aussi que tous les réacteurs de deuxième génération. Pour la même qualité finale de rejet, il est possible de lui appliquer un temps de séjour hydraulique plus court et une charge organique plus élevée. Les fortes charges sont atteintes en utilisant directement des effluents très concentrés ou en appliquant un TSH très court, entre 2 et 24 heures (Nicolella *et al.* 2000). Les charges organiques couramment appliquées sont de 20 à $30 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, mais la littérature révèle la conduite réussie de réacteurs pilotes fonctionnant à des charges proches de $120 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (Aivasidis *et al.* 1988; Ehlinger *et al.* 1994; Buffière 1996), et même de 150 à $180 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (Iza 1991). A l'échelle réelle, de telles conditions ne sont pas atteintes car il est préférable de conserver une marge de sécurité en cas de choc de charge. Les conditions opératoires sont donc fixées aux alentours de $40 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour des TSH de 5 à 24 heures.

I.2.3 Le support solide

I.2.3.1 Type de support

Les matériaux servant de support doivent répondre aux exigences suivantes (Berne *et al.* 1989) :

- surface spécifique importante, variant de 80 à 300 m².m⁻³ (Nicolella *et al.* 2000),
- indice de vide élevé pour éviter le colmatage,
- légèreté, de manière à pouvoir être utilisés sur des hauteurs importantes (4 à 10 m),
- résistance mécanique suffisante (Wheatley 1990),
- inertie biologique,
- stabilité chimique.

Le Tableau I.7 présente différents types de support commercialisés pour les procédés à biomasse fixée et leurs caractéristiques.

Tableau I.7 : Caractéristiques des différents supports (Moletta 2002)

Type de réacteur	Nature du support	Taille en cm	Surface spécifique (m ² .m ⁻³)	Porosité (% vide volumique)	Densité (kg.m ⁻³)	
Lit fixe	Gravier	0,6 - 3,5	100	40	2,5	
	Galets	4	100	42	2,5	
	Vrac	Anneaux céramique	Ø 2,2 x 2,5	49	83	-
			Ø 9	114	95	-
		Anneaux plastique "Flocor"	Ø 3x3	230	95	50-70
		Anneaux plastique "Pall"	Ø 9	102	95	-
		mousse polyuréthane	Pores Ø 0,25	-	95	-
		Ordonné	Tube (drains)	Ø 2,5	70-143	-
	Bloc BF goodrich Vinyl core		120	125	-	-
	Polypropylène perforé		Ø 9	89	95	-
	Cloisonyl		-	220	-	-
Lit mobile	Charbon actif	-	-	60	-	
	Sable	0,3 – 2	2500-4000	40	-	
	U-Sphere	5.10 ⁻³ - 3.10 ⁻²	20 000	40	0,7	

I.2.3.1.1 Supports fixes

En ce qui concerne **les réacteurs à support en vrac**, une grande partie de la biomasse retenue dans le réacteur n'est pas attachée et reste dans les interstices du support, ce qui engendre le colmatage de certaines zones du réacteur et réduit ses performances jusqu'à un dysfonctionnement complet. Ces problèmes peuvent cependant être minimisés par l'emploi d'un support avec un coefficient de vide important souvent supérieur à 90 %. Les pierres et graviers peuvent être utilisés dans les lits fixes, mais ils possèdent des coefficients de vide

inférieurs à 50% et sont ainsi des supports mal adaptés (Weiland *et al.* 1991). De bien meilleurs résultats sont obtenus avec des matériaux de remplissage tels que les plastiques de type PVC flocor, Pall, etc. (Weiland *et al.* 1988; Wheatley 1990). Ce type de support fournit une surface spécifique inférieure à $100 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ ce que réduit la surface disponible au biofilm.

Dans les **réacteurs à support organisé**, le support en vrac est remplacé par un garnissage ordonné constitué de tubes ou de plaques disposés de façon à créer des canaux verticaux. Ces canaux ont pour but de favoriser l'élimination de la biomasse en excès ou des matières en suspension.. Le matériel utilisé pour la construction du support peut être du PVC, de la céramique ou du polyester (van den Berg 1984). L'orientation du garnissage entraîne un coefficient de vide important et une surface spécifique supérieure à $150 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$ (tableau). Cependant, Show et Tay (1999) n'obtiennent qu'une amélioration de 5% du rendement de dépollution en doublant leur surface disponible dans un réacteur à lit fixe. L'aire de surface offerte dans ce type de procédé n'est donc pas le critère unique pour augmenter l'activité bactérienne.

Tableau I.8 : Exemples de supports cités dans la littérature pour les biofiltres anaérobie et la partie filtrante des réacteurs hybrides

Procédé	Support	Auteurs
FA	Celite (Manville biocatalyseur)	Farhan (1997)
FA	Verre et PVC (anneaux)	Show <i>et al.</i> (1999)
FA	Pierre ponce	Kocadagistan <i>et al.</i> (2005)
FA	PVC (Anneaux Raschig)	Pereira <i>et al.</i> (2002)
FA	PVC (Anneaux Raschig)	Puñal <i>et al.</i> (2000)
FA	Tube PVC	del Pozo <i>et al.</i> (2002)
Hybride	Fibres de nylon	Suvajittamont <i>et al.</i> (2003)
Hybride	Plastique (tube)	Hutnan <i>et al.</i> (1999)
Hybride	Polyéthylène (anneaux)	O'Flaherty <i>et al.</i> (1999)
Hybride	Sections de tuyaux en plastique	Buyukkamaci <i>et al.</i> (2004)

I.2.3.1.2 Supports mobiles

Les supports utilisés sont soit naturels (sable, gravier, charbon...) (Fernandez *et al.* 2001), soit synthétiques (plastiques) (Wheatley 1990). Ces derniers semblent avoir la préférence à l'heure actuelle car leur faible densité les rend facilement mobilisables. Le diamètre faible des particules utilisées permet d'atteindre des surfaces spécifiques potentielles pour la colonisation très importante de l'ordre de $1 \text{ à } 25 \text{ m}^2.\text{L}^{-1}$ (Henze *et al.* 1983; Switzenbaum 1983; Hall 1987; Michaud *et al.* 2003). Une surface de solide importante

augmente les chances de fixation des bactéries sur le support et peut être considérée comme un critère de rapidité d'adhésion. De plus, dans le cas des lits fluidisés liquide-solide, un support de petite taille présente un autre avantage : les vitesses du liquide pour fluidiser un support diminuent avec sa taille, ce qui permet de réduire l'énergie de fluidisation et donc les coûts de fonctionnement Jeris (Jeris 1983).

La densité du matériau peut aussi influencer le choix du support pour la même raison économique. De plus, Heijnen (1992) rapporte que les supports de petite taille sont moins soumis aux frictions et génèrent donc moins de contraintes d'attrition lors de la formation du biofilm. Or, des études récentes sur des configurations de réacteurs à forte agitation (conditions turbulentes) montrent que l'adhésion des cellules est plus dominée par les conditions hydrodynamiques que par les caractéristiques physico-chimiques du solide (Gjaltema *et al.* 1997). La forte intensité des collisions entre particules a alors une forte influence négative sur l'adhésion et la formation du biofilm.

Tableau I.9 : Exemples de supports cités dans la littérature pour les réacteurs à lit mobile. LFA : lit fluidisé ascendant, LFD : lit fluidisé descendant, LTI : lit turbulent inverse.

Procédé	Support	Référence
LFA	Biolite	García-Encina <i>et al.</i> (2005) ; Hidalgo <i>et al.</i> (2002) ; Holst <i>et al.</i> (1997)
LFA	Cendre charbon	Ye <i>et al.</i> (2005)
LFA	Charbon actif granulaire	Araki et Harada (1994) ; Farhan (1997) ; Fernández <i>et al.</i> (2001)
LFA	Perles de verre aggloméré	Allaoui et Forster (1994) ; Perez <i>et al.</i> (1997)
LFA	Pierre ponce	Allaoui et Forster (1994)
LFA	Pouzzolane	Buffière (1996)
LFA	Sable	Marin <i>et al.</i> (1999)
LFA	Tests de diatomées	Farhan (1997)
LFA	Zéolite	Fernández <i>et al.</i> (2001)
LFD	Perlite	García-Calderón (1998)
LTI	Extendsphere	Buffière <i>et al.</i> Arnaiz <i>et al.</i> (2005) ; Michaud <i>et al.</i> (2005)

1.2.3.2 Propriétés de surface du support

1.2.3.2.1 Rugosité et porosité de surface

La rugosité est désignée par tous les auteurs comme une des caractéristiques les plus favorables pour la rétention de biomasse (Switzenbaum 1983; Lauwers *et al.* 1989; Fox *et al.* 1990; Kida *et al.* 1990; Heijnen *et al.* 1992; van Loosdrecht *et al.* 1993; Gjaltema *et al.* 1997) puisque la biomasse fixée se trouve dans des zones protégées (Hsu *et al.* 1993). Ce sont les surfaces modérément rugueuses qui présentent les meilleures capacités de rétention, avec des pores d'une dizaine de micromètres (Kuroda *et al.* 1988). Murray et van den Berg (1981) déterminent une taille optimale du pore pour l'immobilisation des cellules, égale de 1 à 5 fois

celle de la cellule. Les supports qui possèdent des surfaces avec des angles très aigus présentent des taux d'abrasion trop élevés, défavorables à la colonisation bactérienne. La colonisation initiale a lieu dans ces micro-cavités, à l'abri des frictions et des mouvements de turbulence du milieu (Morgan *et al.* 1991; Perez *et al.* 1997). Ainsi, Alves *et al.* (Alves *et al.* 1999) réduisent de 50% le temps de démarrage avec un matériau poreux par rapport à du sable.

García-Calderón (1997) obtient une rétention de biomasse plus importante avec la Biolite® qu'avec la pouzzolane, ce qui est attribuable à la plus grande rugosité de surface de la Biolite®. Cependant, l'efficacité globale des deux réacteurs diffère peu, car la partie active du biofilm en surface recouvre une zone non active de biomasse, ce qui tend à baisser l'activité spécifique du biofilm. (Alves *et al.* 1999) estime que cette diminution peut atteindre jusqu'à 50% pour les méthanogènes dans le cas des supports poreux.

I.2.3.2.2 Nature chimique de la surface solide

La nature chimique d'un solide peut avantager les cinétiques des processus impliqués lors de la colonisation (Switzenbaum 1983; Ranalli *et al.* 1995). En effet, la première étape de fixation réversible des bactéries est une étape physico-chimique, elle est donc gouvernée par ce type d'interactions. Verrier *et al.* (Verrier *et al.* 1987) montrent l'importance du caractère hydrophobe de la surface du solide pour la fixation des méthanogènes.

La charge de surface est également présentée comme un caractère important. Les bactéries en solution aqueuse présentent généralement une surface de charge négative, et le caractère positif du support ne peut donc que favoriser le premier contact (Kida *et al.* 1990; Apilánez *et al.* 1998). Ainsi, certains auteurs tels que Gjeltema *et al.* (1997) ont choisi leur support hydrophobe et chargé positivement.

La composition chimique du solide va également influencer cette fixation initiale. Kuroda *et al.* (1988) ainsi qu'Apilanez *et al.* (1998) ont obtenu une colonisation rapide plus importante pour des matériaux composés de carbone. Borja et Banks (1994), en comparant des supports argileux, montrent que les supports à base de magnésium tels que la sépiolite ont des capacités de rétention de biomasse supérieures aux alumines, comme la bentonite. Ils montrent également que le rapport entre bactéries hydrolytiques et *Archaea* méthanogènes varie selon le support (3:1 pour la sépiolite contre 100:1 pour la bentonite (Borja *et al.* 1994)) et influence en conséquence les cinétiques de dégradation de différents types d'effluents. Ainsi, pour un rejet d'abattoir riche en graisses et en protéines nécessitant pour être dégradé une phase importante d'hydrolyse, l'utilisation de la bentonite retenant mieux les bactéries

hydrolytiques permettra une meilleure efficacité de dégradation. La sépiolite favorise donc la rétention des méthanogènes acétoclastes alors que la diabase (résidus de roches volcaniques) retient en nombre plus important les méthanogènes hydrogénophiles (Sanchez *et al.* 1994).

Lorsque le solide utilisé comme support relargue des éléments dans le milieu, l'effet inhibiteur autant qu'activateur est à considérer lors du choix du support (Alves *et al.* 1999). Murray et van den Berg (1981) discutent de l'effet stimulant du fer présent dans l'argile. L'argile relargue du fer dans le milieu de façon lente, permettant ainsi d'éviter la précipitation de ce cation qui conserve sa disponibilité pour les bactéries attachées. La capacité d'adsorption et de désorption des solutés par le support favorise la formation du biofilm (Pirbazari *et al.* 1990). Ranalli *et al.* (1995) mettent en évidence l'influence importante du support sur la variation du pH dans le milieu qui peut, parfois, aboutir à une inhibition.

I.2.4 Démarrage des digesteurs anaérobies à biomasse fixée

I.2.4.1 Définitions

La Figure I.12 présente schématiquement l'évolution de l'efficacité d'élimination d'un procédé biologique lors du lancement des digesteurs anaérobies à biomasse fixée. Quatre phases peuvent être distinguées : la phase initiale correspondant à l'inoculation (ou ensemencement) du réacteur, la phase de latence, la montée en charge, et la phase stationnaire. Le démarrage regroupe les trois premières étapes.

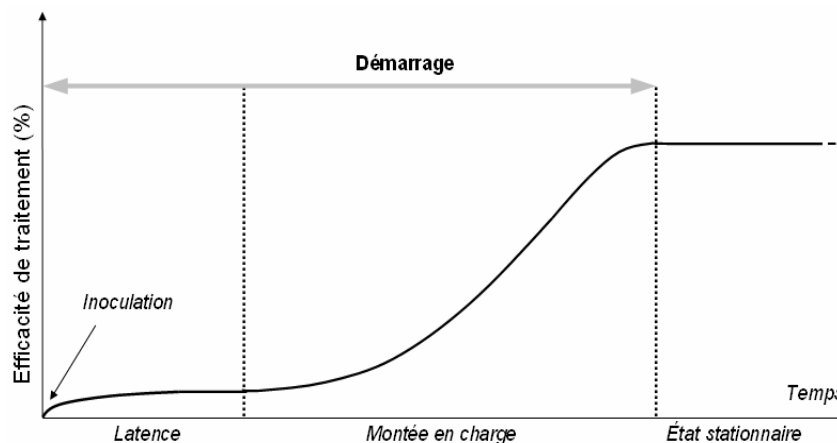


Figure I.12 : Représentation théorique du fonctionnement d'un réacteur biologique

La phase de démarrage peut être définie comme le temps nécessaire à la sélection et à la structuration spatiale d'un consortium microbien efficace pour la dégradation des polluants (Weiland *et al.* 1991). D'un point de vue biologique, cette phase correspond à la mise en place d'un biofilm mature, soit la formation d'un écosystème par la sélection et l'arrangement

spatial des différents groupes trophiques les uns par rapport aux autres et vis à vis de leur substrat (Heppner *et al.* 1992). Dans le domaine industriel, le démarrage correspond au temps nécessaire pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration conforme aux spécifications du rejet : pour Prakash et Kennedy (1996), par exemple, le démarrage correspond au temps nécessaire pour que le réacteur traite une charge organique de $2,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ avec une DCO à l'entrée de $2,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ et une efficacité d'épuration de 80%.

La durée du démarrage d'un réacteur anaérobie à forte charge est longue et très variable, généralement entre 2 et 9 mois (Lauwers *et al.* 1989), voire 12 mois (Bull *et al.* 1983) ou plus encore pour les procédés thermophiles (Puñal *et al.* 2000). Elle dépend de nombreux paramètres biologiques, chimiques et physiques.

Comme le montre la Figure I.13, le démarrage est influencé par la composition et la charge de l'effluent à traiter, l'activité et l'adaptation de l'inoculum, les paramètres environnementaux (pH, température, présence et concentration en nutriments et éléments traces), les paramètres opérationnels (temps de séjour hydraulique, mélanges des phases), le design du réacteur.

Enfin la phase de démarrage est inextricablement liée aux différentes phases de formation du biofilm (conditionnement des surfaces, adhésion sur le support et agrégation des cellules en un biofilm chapitre I.3.2), influencées par des paramètres physico-chimiques, les conditions hydrodynamiques et l'augmentation de la charge organique (Zellner *et al.* 1991). La montée en charge et la croissance du biofilm sont fortement liées. La distinction entre ces deux paramètres qui paraît complexe fait l'objet d'un approfondissement au cours des chapitres suivants.

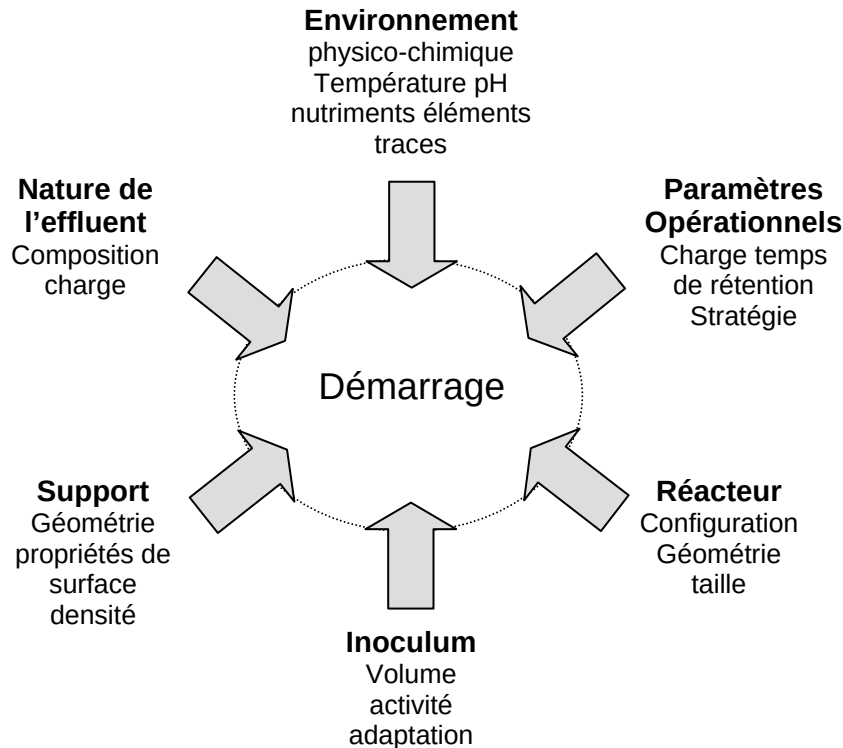


Figure I.13 : Paramètres influençant le démarrage des réacteurs à forte charge

La réduction de la durée de démarrage est un des paramètres clés pour augmenter la compétitivité des réacteurs anaérobies à fortes charges (Weiland *et al.* 1991). La mise au point d'un protocole standard efficace de démarrage des réacteurs anaérobies à biomasse fixée faciliterait leur utilisation au niveau industriel.

I.2.4.2 Inoculation

Une étape d'inoculation est systématiquement mise en œuvre pour démarrer un réacteur. L'objectif est d'apporter une flore microbienne adaptée et efficace en terme de dégradation des polluants. Cet aspect du démarrage des réacteurs anaérobies reste empirique et peu d'études ont été effectuées.

Un bon mélange du réacteur est nécessaire durant cette phase pour optimiser le contact entre le support et les microorganismes. L'utilisation de la sortie d'un réacteur en flux continu pour l'ensemencement d'un nouveau digesteur présente de bons résultats puisqu'elle apporte à la fois des cellules mises en suspension et des conditions environnementales favorables (pouvoir tampon, potentiel d'oxydoréduction) : cette méthode reste cependant peu réalisable à l'échelle industrielle.

Peu de travaux mentionnent les quantités d'inoculum utilisées, leur activité ou leur provenance, rendant toute comparaison très difficile à établir. Un ensemencement efficace nécessite de disposer d'une quantité de boues suffisante. Un ensemencement massif est préconisé par Salkinoja-Salonen *et al.* (1983), ceci afin de multiplier les contacts entre le support et la biomasse libre pour faciliter la fixation (Weiland *et al.* 1991). Annachhatre et Bhamidimarri (1992) recommande une concentration de $20 \text{ kg}_{\text{MVS}}.\text{m}^{-3}$ de boues acclimatées durant toute la période de démarrage. De nombreux auteurs préconisent l'utilisation de boues anaérobies de stations urbaines, qui possèdent généralement une flore bactérienne assez complexe capable de traiter de nombreux types d'effluents. Les mélanges de boues d'origines différentes (station, lagune) permettent de s'assurer d'une grande diversité dans les populations bactériennes présentes, afin d'augmenter la possibilité de dégrader des composés complexes présents dans certains effluents. Le calcul de l'activité des boues a été préconisé afin d'établir une quantité standard d'inoculation suivant la charge nominale à traiter (Camilleri 1988).

Une période d'acclimation de 1 à 3 semaines sur l'effluent à traiter est recommandée par (Camilleri 1988), mais certains auteurs utilisent des temps d'adaptations beaucoup plus longs, de 2 mois (Austermann-Haun *et al.* 1997) à 3 mois (Chen *et al.* 1985). Certains auteurs parviennent à réduire la phase de démarrage à 10 jours en utilisant un support déjà colonisé d'un autre réacteur de même type en fonctionnement (Holst *et al.* 1997). Ceci permet d'éviter l'étape de colonisation initiale limitante pour le démarrage des systèmes à biomasse fixée (Arnaiz *et al.* 2005). De même, pour les réacteurs à lit de boue, l'étape de la granulation peut être contournée par l'achat de granules déshydratés (Weiland *et al.* 1991). L'utilisation de boues granulaires plutôt que des boues libres dans le cas d'un réacteur compartimenté réduirait considérablement la phase de démarrage du réacteur (Freese *et al.* 2000).

1.2.4.3 Stratégie de montée en charge

Le but de cette phase reste de parvenir le plus vite possible à la charge nominale sans créer de perturbations de l'écosystème anaérobie. Deux paramètres primordiaux peuvent être considérés lors de l'augmentation de la charge organique :

- **Le temps de séjour hydraulique (TSH)**

Lors de l'ensemencement d'un réacteur, toutes les bactéries se trouvent en suspension dans la phase liquide, sous forme planctonique ou floculée, et le temps de séjour de la biomasse libre correspond alors au temps de séjour hydraulique. Selon van Loodsrecht et

Heijnen (1989; Tijhuis *et al.* 1994), pour favoriser la fixation, le taux de dilution du système $D = Q/V$ doit être inférieur au taux maximum de croissance des bactéries ($\mu_{\max}$) concernées afin : i) d'éviter la mobilisation du substrat par les bactéries libres au détriment des microorganismes attachés, ii) de favoriser le lessivage des bactéries libres. Par conséquent, pour des raisons de compétition avec les cellules libres, un TSH court semble le plus indiqué pour favoriser la fixation et la croissance des bactéries attachées. La stratégie communément appliquée pour le démarrage des réacteurs industriels est l'augmentation de la charge par diminution du TSH dans le réacteur (augmentation du débit d'alimentation à concentration constante). En réacteur compartimenté, Barber et Stuckey (1998) montrent le succès d'une stratégie de diminution du TSH, par rapport à une stratégie d'augmentation de la concentration de l'alimentation à TSH constant : ils obtiennent un démarrage plus rapide mais aussi plus stable. Ces auteurs supposent que la baisse du TSH provoque une perturbation moins importante que la hausse de la concentration de l'alimentation.

- L'activité biologique

Pour certains auteurs, la stratégie de démarrage consiste à augmenter l'apport en matière organique tout en conservant un rendement épuratoire suffisamment élevé. Cette stratégie s'accompagne le plus souvent d'une montée en charge par paliers de 5 à 10% en fonction des capacités épuratoires. Araki et Harada (1994) ont cherché à assurer un rendement minimum de 80% alors que Camilleri (1988) a maintenu une concentration d'acétate en sortie très faible, inférieure à $20 \text{ mg}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$. Heijnen démontre toutefois que l'augmentation de la charge n'est pas liée à un critère de performance d'épuration, mais plutôt à des critères d'activités biologiques (Heijnen *et al.* 1989). L'augmentation de la charge continue et progressive doit ainsi avoir lieu tout en conservant une activité biologique optimale : il s'agit de respecter au mieux les exigences nutritionnelles du procédé afin d'éviter les chocs transitoires (Stronach *et al.* 1987). Une telle approche peut être mise en place grâce à une conduite automatique basée sur des mesures effectuées en ligne par différents capteurs ou bien grâce à une stratégie prédéfinie (Weiland *et al.* 1988).

1.2.4.4 Conduite automatique des bioprocédés

Le développement de stratégies de conduite automatique des digesteurs peut également permettre la réduction du temps de démarrage et la mise en place de stratégies reproductibles plus rigoureuses (Weiland *et al.* 1991). Le gain de temps est imputable à la détection des perturbations dans le réacteur en temps réel, suivie par des commandes sous

forme d'actions correctives instantanées. Ces dernières vont permettre d'éviter les chocs physico-chimiques et d'optimiser les apports nutritifs pendant la formation du biofilm.

Les résultats avec un suivi hors ligne sont généralement inférieurs à ceux obtenus avec des systèmes automatisés pour des raisons évidentes de retard dans les détections et les réponses en cas de dysfonctionnement.

La conduite automatique assure un suivi en ligne de nombreux paramètres (pH, débit de biogaz, alcalinité, concentration d'H₂ dans la phase gazeuse, concentration en AGV). Elle permet un ajustement instantané des conditions opératoires optimales pour le système (alimentation, régulation du pH), en palliant instantanément toute perturbation biologique ou physico-chimique. Son utilisation et un contrôle correct du système permettraient de réduire la phase de démarrage (Cecchi *et al.* 1992). Austermann–Haun *et al.* (1994) ont obtenu un meilleur démarrage avec un lit fixe, en efficacité et en délai, grâce à une alimentation auto-régulée par le pH : une charge de 60 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ contenant un mélange d'AGV a été atteinte en 36 jours seulement. Liu *et al.* (2004) parviennent à traiter une charge de 20 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ après 110 jours de montée en charge automatique basée sur un contrôle par le pH et le débit de biogaz. D'autres procédures de contrôle, telles que le dispositif Méthaveil (Ehlinger *et al.* 1994; Holst *et al.* 1997), sont basées sur l'analyse de 3 paramètres mesurés en ligne : pH, débit de biogaz et concentration d'H₂ dans la phase gazeuse, permettent de suivre la stabilité du réacteur.

Si le système le permet, une montée en charge progressive est réalisée, les corrections sur le débit d'alimentation si nécessaires permettent d'optimiser le temps pour amener le digesteur à sa charge nominale sans dysfonctionnement. Certaines commandes ont été développées dans le but d'établir une stratégie de montée en charge très agressive, notamment par l'ajout de perturbations (Steyer *et al.* 1999). Cette méthode consiste à créer des perturbations importantes sur le débit d'alimentation et d'observer la réponse du système par la production de biogaz. En fonction de cette réponse, il est alors possible de calculer le débit d'alimentation optimal pour le système. Cependant, bien que la conduite automatique de digesteurs anaérobies à biomasse fixée connaisse un développement important en laboratoire, son application à l'échelle industrielle reste limitée. Les raisons majeures sont les coûts et la fiabilité des capteurs en ligne, ainsi que leur maintenance et la qualification de l'opérateur que leur entretien nécessite. Il a été cependant démontré qu'un tel appareillage couplé à un système de contrôle approprié permettait de réaliser de larges bénéfices. Le choix des constructions se dirige encore vers des systèmes surdimensionnés de 15-30 % plutôt que vers des installations optimisées par la conduite automatique.

1.2.5 Influence du procédé et des conditions opératoires sur la durée du démarrage

Le Tableau I.10 montre les disparités des temps de démarrage suivant les procédés choisis. En ce qui concerne les réacteurs à lit de boues, les biofiltres ou les réacteurs hybrides, les temps de démarrage peuvent être plus courts, notamment en raison de la rétention de la biomasse inoculée dans le réacteur. Une étude comparative des vitesses de démarrage entre un UASB et un biofiltre a montré un net avantage au filtre grâce une immobilisation rapide, efficace et plus importante du consortium méthanogène par rapport à celui des granules (Gijzen *et al.* 1996). Cet avantage est de courte durée puisque les auteurs parviennent à la même charge nominale après une durée équivalente pour les deux types de réacteurs.

Tableau I.10 : Caractéristiques du démarrage de digesteurs anaérobies à forte charge et vitesse de montée en charge - données bibliographiques

Procédé	Effluent	DCOdeg. ($\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$)	Durée (jours)	Vitesse * ($\text{mg}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-2}$)	Références
BRC	Saccharose	5,6	140	40,0	Barber et Stuckey (1998)
BRC	Acétate + glucose	15	90	166,7	Hutnan <i>et al.</i> (1999)
EGSB	Acide gras	9,5	86	110,5	Dinsdale <i>et al.</i> 1999
EGSB	Lait écrémé	5,6	160	35,0	Pereira <i>et al.</i> (2002)
FA	Laiterie	3	84	35,7	Anderson et al. (1994)
FA	Mélange d'AGV	42	36	1166,7	Austermann-Haunet <i>et al.</i> (1994)
FA	Lait en poudre	4	40	100,0	Bull <i>et al.</i> (1982)
FA	Laiterie	15	200	75,0	Camilleri (1988)
FA	Sucrierie (canne)	13	90	144,4	Camilleri (1988)
FA	Sucrierie (betterave)	18	90	200,0	Camilleri (1988)
FA	Amidonnerie	15	300	50,0	Camilleri (1988)
FA	Crème glacée	10	150	66,7	DaMarques <i>et al.</i> (1989)
FA	Crème glacée	12	123	97,6	DaMotta Marques <i>et al.</i> (1989)
FA	Abattoir	3,22	33	97,6	Del Pozo <i>et al.</i> (2002)
FA	Acide acétique	14	170	82,4	Elhinger <i>et al.</i> (1987)
FA	Glucose	6	80	75,0	Farhan (1997)
FA	Glucose	13,2	140	94,3	Gijzen et Kansiime (1996)
FA	Glucose	15,51	60	258,5	Kocadagistan <i>et al.</i> (2005)
FA	Synthétique	22	110	200,0	Liu <i>et al.</i> 2004
FA	Laiterie	5,55	240	23,1	Omil <i>et al.</i> (2003)
FA	Laiterie	6,65	60	110,8	Omil <i>et al.</i> (2003)
FA	Amidonnerie	10	200	50,0	Paris <i>et al.</i> (1988)
FA	Lait écrémé	9,6	200	48,0	Pereira et al (2002)
FA	Lactose	4,8	26	184,6	Puñal <i>et al.</i> (2000)
FA	Glucose + peptone	16	219	73,1	Show et al (1999)
FA	Glucose + peptone	0,5	42	11,9	Show et Tay (1998)
FA	Distillerie de Raki	5	30	166,7	Timur <i>et al.</i> (1988)
FA	Amidonnerie	8	90	88,9	Van Rompu <i>et al.</i> (1988)
FA	Pétrochimie	2,5	160	15,6	Vogel et Winter (1988)
Hybride	Distillerie orge et blé	4,743	20	237,2	Blonskaja <i>et al.</i> (2002)
Hybride	Molasse	10	130	76,9	Buyukkamaci et al. (2004)
Hybride	Acétate + glucose	15	120	125,0	Hutnan <i>et al.</i> (1999)
Hybride	Huile de palme	19,55	33	592,4	Najafpour <i>et al.</i> (2005)
Hybride	AGV (C2 à C4) + éthanol	5,7	51	111,8	O'Flaherty <i>et al.</i> (1999)

Hybride	Amidonnerie	4,675	60	77,9	Suvajittamont <i>et al.</i> (2003)
IFBR	Glucose	7	120	58,3	Chan Choi <i>et al.</i> (1995)
LFA	Crème glacée	11	80	137,5	Allaoui et Forster (1994)
LFA	Acide acétique	14	70	200,0	Allaoui et Forster (1994)
LFA	Sucre + lait écrémé	10	100	100,0	Araki et Harada (1994)
LFA	Distillerie + méthanol	5,16	63	81,9	Balaguer <i>et al.</i> (1997)
LFA	Distillerie de vin	40	60	666,7	Buffière (1996)
LFA	Lait en poudre	6,25	40	156,3	Bull <i>et al.</i> (1982)
LFA	Viandox + méthanol	5	40	125,0	Bull <i>et al.</i> (1983)
LFA	Glucose	1,33	60	22,2	Chen <i>et al.</i> (1985)
LFA	Laiterie	5	30	166,7	DaMotta Marques <i>et al.</i> (1990)
LFA	Acide acétique	0,7	25	28,0	Elhinger <i>et al.</i> (1989)
LFA	Glucose	6	95	63,2	Farhan (1997)
LFA	Glucose	6	55	109,1	Farhan (1997)
LFA	Vinasse de distillerie	11,745	110	106,8	Fernández <i>et al.</i> (2001)
LFA	Vinasse de distillerie	7,8	30	260,0	Fernández <i>et al.</i> (2001)
LFA	Acide acétique	10,6	180	58,9	Fox <i>et al.</i> (1990)
LFA	AGV (C2 à C4) + éthanol	7,29	30	243,0	Garcia-Encina <i>et al.</i> (2005)
LFA	Propionate	8,5	120	70,8	Heppner <i>et al.</i> (1992)
LFA	Acétate	4,9	170	28,8	Hidalgo <i>et al.</i> (2002)
LFA	Distillerie de vin	61	51	1196,1	Holst <i>et al.</i> (1997)
LFA	Distillerie de vin	20	15	1333,3	Holst <i>et al.</i> (1997)
LFA	Amidonnerie	35	10	3500,0	Holst <i>et al.</i> (1997)
LFA	Acide acétique	80	140	571,4	Hsu et Shieh (1993)
LFA	Caoutchouc	0,9	240	3,8	Isa <i>et al.</i> (1988)
LFA	Sucrierie (betterave)	8	120	66,7	Iza <i>et al.</i> (1988)
LFA	Levurerie	7	121	57,9	Lo et Liao (1990)
LFA	Ethanol	3,4	180	18,9	Marin <i>et al.</i> (1999)
LFA	Distillerie de vin	3,81	75	50,8	Perez <i>et al.</i> (1997)
LFA	Distillerie de vin	32	94	340,4	Perez <i>et al.</i> (1999)
LFA	Saccharose	2,5	35	71,4	Prakash et Kennedy (1996)
LFA	Lisier de porc	2,16	50	43,2	Ranalli <i>et al.</i> (1995)
LFA	Viandox + méthanol	5,3	50	106,0	Stronach <i>et al.</i> (1986)
LFA	Pâte à papier	17	70	242,9	Vogel et Winter (1988)
LFA	Saccharose	15	45	333,3	Ye <i>et al.</i> (2005)
LFA	Saccharose	15	30	500,0	Ye <i>et al.</i> (2005)
LFA	Mélange d'AGV (C2 + C4)	34,5	55	627,3	Zellner <i>et al.</i> (1991)
LFD	Glucose	20	60	333,3	Garcia-Calderón (1998)
LFD	Distillerie de vin	30	60	500,0	Garcia-Calderón (1998)
LTI	Vinasse de distillerie	19,173	90	213,0	Arnaiz et al (2005)
LTI	Vinasse de distillerie	12,324	31	397,5	Arnaiz et al (2005)
LTI	Glucose	3,3	80	41,3	Michaud et al (2002)
LTI	Vinasse de distillerie	8	100	80,0	Michaud et al (2005)
UASB	Abattoir	6,5	52	125,0	Caixeta <i>et al.</i> (2001)
UASB	Glucose	13,2	140	94,3	Gijzen et Kansime (1996)
UASB	Acétate + glucose	15	90	166,7	Hutnan <i>et al.</i> (1999)
UASB	Traitement des légumes	21,6	134	161,2	Lepistö (1997)
UASB	Amidonnerie	10	114	87,7	Paris <i>et al.</i> (1988)
UASB	Glucose + peptone	19,2	92	208,7	Show <i>et al.</i> (2004)
UASB	Glucose + peptone	29,6	118	250,8	Show <i>et al.</i> (2004)
UASB	Saccharose	1,4	60	23,3	Tiwari <i>et al.</i> (2005)
UASB	Abattoir	24,9	95	262,1	Torkian <i>et al.</i> (2003)
UASB	Usine de café	10	42	238,1	Viña <i>et al.</i> (1988)
UASB	Mélange d'AGV (C2 à C4)	37,5	100	375,0	Wiegant <i>et al.</i> (1985)

* La vitesse de montée en charge est égale à la charge volumique traitée divisée par la durée de démarrage.

La **composition organique** de l'effluent influence significativement les proportions des microorganismes hydrogénophiles et acétoclastes de la flore méthanogène. La sélection des microorganismes au cours de la formation du biofilm anaérobie dépend principalement des caractéristiques de la source d'alimentation (Ehlinger *et al.* 1987). La stabilité dans la composition et la concentration de l'effluent à traiter lors du démarrage semble affecter grandement les performances du digesteur (Stronach *et al.* 1987). L'utilisation de substrats complexes, nécessitant l'intervention de plusieurs catégories de bactéries, semble réduire ce temps de mise en place du biofilm et aboutir à la production d'une quantité plus importante de biofilm. De même, la nature de la source de carbone semble influencer considérablement la production d'EPS. (Ribeiro *et al.* 2005). L'utilisation exclusive de substrats simples tels que l'acétate (Hsu *et al.* 1993), l'éthanol (Marin *et al.* 1999), le butyrate (Zellner *et al.* 1991) et plus particulièrement le propionate (Gorris *et al.* 1988; Heppner *et al.* 1992) conduit généralement à des démarrages sensiblement plus longs que des substrats complexes ou des mélanges d'AGV. Ils exigent alors des temps de fonctionnement supérieurs à 4 mois pour la phase de démarrage.

Camilleri (Camilleri 1988) a répertorié des temps de démarrage de filtres anaérobies industriels en distinguant 3 types de substrats :

- Les effluents de sucreries et de distilleries avec des démarrages de l'ordre de 3 mois.
- Les effluents laitiers dont les temps sont un peu plus longs (6 à 8 mois).
- Les effluents d'amidonnerie où les temps de démarrage sont plutôt proches de l'année.

Ces derniers semblent en effet plus difficiles à traiter comme en témoignent les essais de Paris *et al.* (1988) ou van Rompu *et al.* (1988). Des temps plus courts de 20 jours sont cités pour les effluents d'abattoirs (Kang *et al.* 1997) ou de 60 jours pour des effluents de distilleries (Buffière 1996; García-Calderón 1997). Le taux de croissance faible des organismes méthanogènes retarde la formation du biofilm anaérobie. C'est pourquoi certains opérateurs ont cherché à optimiser cette croissance par une complémentation spécifique dans l'alimentation. Bull *et al.* (1983) ainsi que Balaguer *et al.* (1997) ont utilisé avec succès du méthanol dans l'alimentation pour le démarrage. Le méthanol est un substrat directement métabolisable par les microorganismes méthanogènes, leur donnant un avantage compétitif vis à vis des bactéries sulfato-réductrices, et qui permet donc de favoriser leur croissance. Il permet également d'augmenter le rapport C/N dans l'alimentation, ce qui favorise la production de polysaccharides responsables de l'attachement des cellules (Puñal *et al.* 2000). Cependant, l'effet positif concerne uniquement la phase d'attachement cellulaire car par la

suite, la quantité d'azote devient limitante pour la croissance. En outre, un rapport C/N faible stimule la production des protéines, au détriment des exopolysaccharides (Huang *et al.* 1994) et les protéines représentent un composé majoritaire lors la phase de croissance du biofilm (Ehlinger *et al.* 1989).

Conclusion

L'utilisation de la capacité naturelle des microorganismes à s'agréger entre eux et/ou à se fixer sur un support solide et à former une matrice de polymères biologiques apparaît donc comme une solution permettant d'améliorer l'efficacité des procédés de digestion anaérobie en augmentant leur capacité à la rétention de biomasse microbienne. Les avantages de ces procédés à biomasse fixée pour la digestion anaérobie ont été soulignés (rétention de la biomasse, robustesse, fortes charges ...), leur limite se situant dans la durée de la phase de démarrage. Les biofilms mis en jeu sont le résultat de l'adhésion puis du développement de micro-organismes au niveau de surface ou interface exposée à un environnement humide et non stérile. Leurs mécanismes de développement sont abordés au cours du chapitre suivant.

I.3 Le biofilm

I.3.1 Définitions

L'adhésion des micro-organismes aux surfaces est un phénomène universel et les microorganismes non fixés dans le milieu environnant sont minoritaires. Les bactéries libres ne représenteraient ainsi que 0,5 % de la population bactérienne totale (Characklis *et al.* 1990).

Les biofilms sont des formations cellulaires hautement structurées, au sein desquelles des cellules microbiennes sont englobées dans une matrice complexe. L'organisation, la forme, la densité de ces assemblages supra-cellulaires sont une réponse aux variations des conditions environnementales. La formation des biofilms constitue donc la stratégie privilégiée de survie développée par les microorganismes.

Cette capacité des bactéries à s'organiser sur une surface leur confère de nombreux avantages sur les populations planctoniques. La fixation garantit souvent une position stable à proximité d'une source de nourriture, une optimisation des transports de substrat vers les microorganismes et des déchets vers l'extérieur (Costerton *et al.* 2001). Dans le cas de biofilms hétérogènes mettant en jeu une chaîne trophique, la proximité spatiale permet une

meilleure disponibilité des substrats pour les différentes espèces bactériennes syntrophes. Les cellules microbiennes enfouies dans l'épaisseur du biofilm sont protégées des agressions éventuelles du milieu extérieur (ultraviolets, choc toxique, prédation...) et elles peuvent ainsi survivre dans des conditions d'environnement défavorables (milieux pauvres en nutriments comme l'eau de mer, par exemple) (Costerton *et al.* 2001). Dans les environnements naturels, les biofilms jouent donc un rôle de réservoir d'espèces microbiennes et garantissent l'équilibre écologique. Les biofilms se construisent et évoluent en conjuguant de fortes interactions entre la dynamique des systèmes vivants, l'évolution de la surface support et la chimie du milieu. Ce sont des lieux de gradients, de couplage des phénomènes biologiques et physico-chimiques, de transfert de matière et d'échanges d'informations chimiques et biologiques (quorum sensing, transfert de gènes...) (Wimpenny 2000 a). Appréhender la globalité des biofilms et déchiffrer leurs mécanismes intimes exige de croiser les compétences issues de nombreux domaines scientifiques complémentaires : écologie microbienne, biologie moléculaire, microbiologie, chimie des solutions, physico-chimie des surfaces, mécanique des fluides, ingénierie, etc.

I.3.2 Formation du biofilm

La formation du biofilm est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes. Le nombre d'étapes varie en fonction des auteurs et du niveau de détail recherché. Characklis et Marshall (1990) signalent que la progression du processus de la croissance d'un film microbien sur une surface solide prend fréquemment la forme d'une courbe sigmoïde divisée en trois phases (Figure I.14): une phase d'initiation qui aboutit à l'attachement des microorganismes, une phase d'accumulation contemporaine de la formation des microcolonies, une phase d'équilibre et de maturation du biofilm.

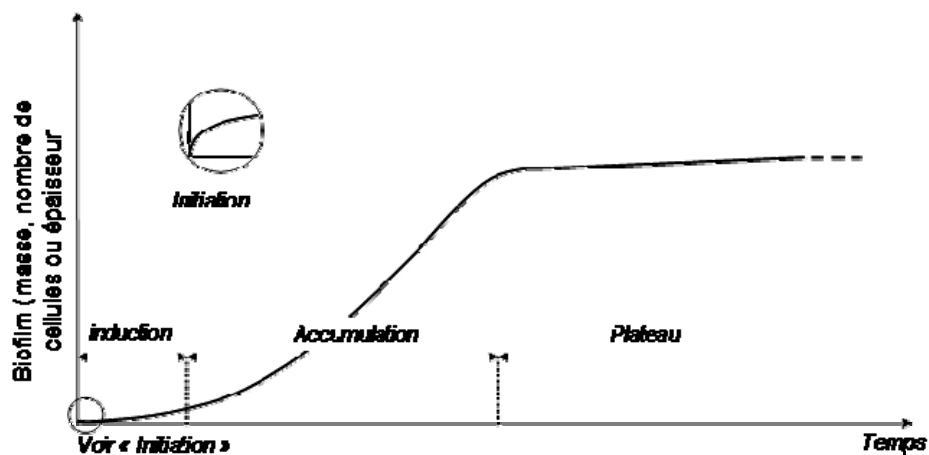


Figure I.14 : Progression de la formation d'un biofilm (Characklis *et al.* 1990).

Tout au long du processus de formation du biofilm, différents signaux environnementaux (type de surface, contraintes physiques, disponibilité en éléments nutritifs, transferts de masse, etc...) vont avoir un impact sur l'architecture du biofilm et sur la structuration des populations microbiennes qui le constituent (Wimpeny *et al.* 2000 b). Les trois phases proposées par Charachlis et Marshall (1990) sont maintenant détaillées.

I.3.2.1 Initiation, induction et attachement des microorganismes aux surfaces

Cette première phase correspond à une période d'adhésion pendant laquelle les bactéries s'adaptent à leur nouvel environnement. Ce processus de formation initiale du biofilm peut être décrit comme la succession de cinq étapes (Figure I.15): le conditionnement, le transport, l'adhésion réversible, l'ancrage ou bio-attachement et la co-adhésion ou co-agrégation.

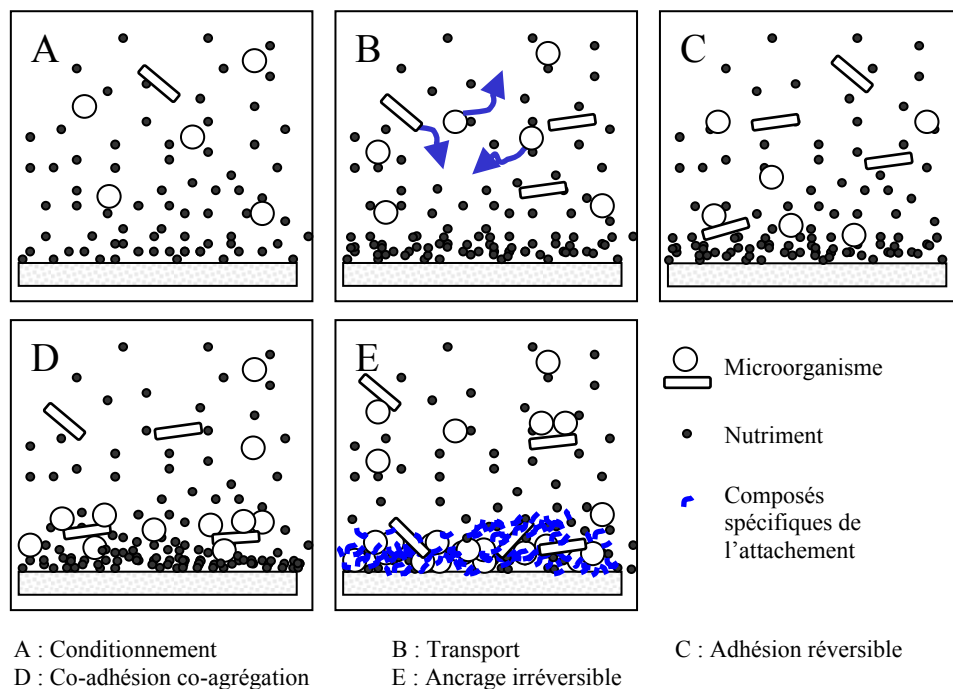


Figure I.15 : Représentation schématique des phases successives de la formation d'un biofilm (Bos *et al.* 1999)

- Le conditionnement :

Le conditionnement de la surface est un processus presque instantané, autant en régime laminaire que turbulent. Les molécules situées à la surface d'un solide, par leur position, disposent d'un excès d'énergie qui les poussent à interagir avec les molécules dissemblables extérieures. Plongé dans un liquide, un solide acquiert une charge de surface soit par ionisation, soit par adsorption d'ions (Bos *et al.* 1999). Dans un délai très bref, suite à

l'exposition du solide au milieu aqueux, des macromolécules organiques sont adsorbées à sa surface. Leur présence va faciliter la fixation ultérieure des microorganismes et conditionner leur développement.

- Le transport

Sous l'effet de la gravité dans un environnement calme, de la diffusion dans un environnement soumis à un régime d'écoulement laminaire, et de la convection majoritaire en régime turbulent, ou encore par un mouvement actif, la cellule en suspension dans le milieu est transportée vers la surface et entre en contact avec celle-ci. En l'absence de ces phénomènes qui sont à l'origine du transport des microorganismes, il n'est pas possible de savoir avec certitude si la non-adhérence est due à la faible affinité des microorganismes pour le substratum ou à cette absence de transport de masse (Bussher *et al.* 2000).

- L'adhésion réversible

L'adhésion réversible fait appel à des phénomènes physiques généralement non spécifiques. Les forces d'attraction qui entrent en jeu varient selon le type de support et le type de microorganismes, mais celles qui interviennent généralement dans ce processus sont soit chimiques (forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes), soit électrostatiques. En milieu liquide, la surface des microorganismes ainsi que celle de la plupart des supports est chargée négativement (Bos *et al.* 1999). En première approximation, la théorie *D.L.V.O.* (Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (1948) : théorie décrivant les mouvements de colloïdes) qui décrit les changements d'énergie libre d'interaction entre deux corps peut être appliquée aux microorganismes en suspension. Selon l'approche classique de cette théorie, des particules et des surfaces planes immergées dans de l'eau sont soumises à trois forces non-covalentes :

- les forces de Lifshitz-van der Waals (LW),
- les forces de Lewis acide-base (AB) qui génèrent des interactions non-covalentes basées sur les propriétés de donneur ou d'accepteur d'électrons de certaines molécules polaires plongées dans un environnement aqueux,
- et les forces entre doubles couches électriques (EL) générées par les mouvements Browniens. Ce type d'interaction est pris en compte dans la théorie *D.L.V.O.* étendue qui intègre à l'approche classique, la dimension hydrophobe des interactions qui s'établissent entre les corps en solution (Bos *et al.* 1999).

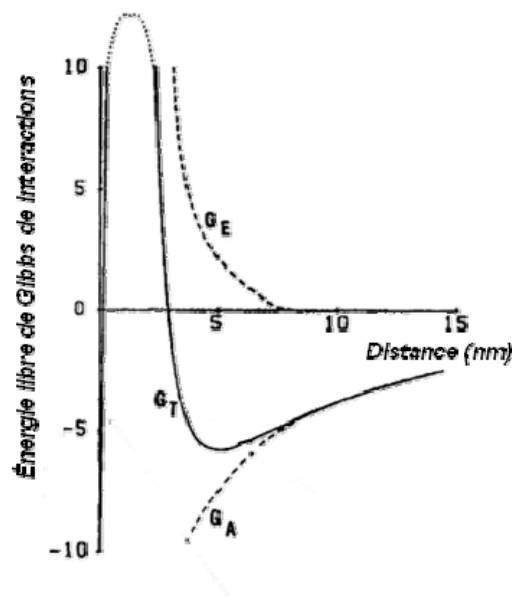


Figure I.16 : Variation de l'énergie de Gibbs en fonction de la distance entre une bactérie (assimilée à une sphère) et une surface chargée négativement (Hulshoff Pol *et al.* 2004). G_T représente la somme des énergies libres des forces G_A (Lifshitz-van der Waals) et G_E (électrostatiques).

La présence d'appendices protéiques solidement ancrés dans la membrane cytoplasmique est courante chez les bactéries. Ces appendices jouent un rôle aussi bien dans la mobilité des cellules (par les flagelles) que dans leur adhésion, spécifique ou non, à des surfaces (par les pili). Dans la Figure I.17, la ligne pointillée indique la limite de la distance d'approche la plus faible (l) pour une cellule ou particule hydrophile lisse avec un rayon de courbure relativement grand. Une cellule ou particule sphérique hydrophile lisse ne peut pas entrer en contact avec une surface hydrophile plane lisse parce que leur répulsion mutuelle aspécifique, à échelle macroscopique, les empêche de s'approcher à moins de 4 ou 5 nm environ (Figure I.17 A). Alors qu'à cette même distance, une cellule ou particule sphérique semblable pourvue de protubérances longues et minces en forme d'aiguille dont les extrémités ont un petit rayon de courbure pouvant pénétrer facilement le champ de répulsion à l'échelle macroscopique, et établir ainsi un contact spécifique à l'échelle microscopique (Figure I.17 B). (van Hoss 2005).

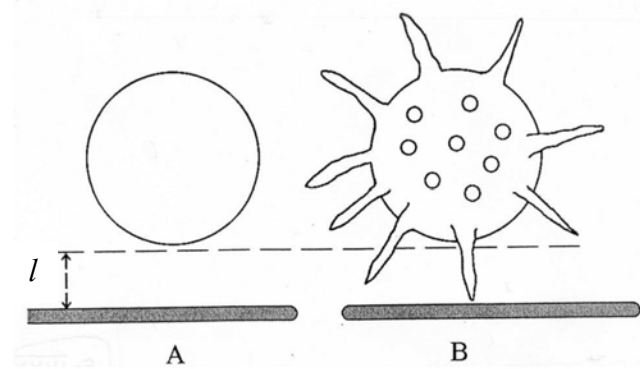


Figure I.17 : Présentation schématique des différences d'accessibilité des corps sphériques et d'une surface plane (van Hoss 2005)

- Adhésion irréversible : co-adhésion et co-agrégation

Lors d'une adhésion irréversible, la bactérie adsorbée sur la surface va se fixer activement par son activité métabolique. La cellule sécrète une substance, généralement polysaccharidique, qui lui permettra par la suite de s'encapsuler littéralement sur la surface. Ce bio-attachement est beaucoup plus lent et dépend du type de bactérie, de l'importance de sa population dans le milieu et de la durée de sa phase de croissance (Characklis *et al.* 1990). Il dépend également du milieu dans lequel se trouve la bactérie : température, pH, concentration en électrolyte et disponibilité de nutriments (Lazarova *et al.* 1995). Enfin, la force d'attachement est aussi fonction de la charge de la surface et de la durée du contact (Gjaltema *et al.* 1991). Tous ces facteurs influencent grandement la phase de colonisation d'un support par un biofilm bactérien. Les interactions entre les espèces bactériennes dans le biofilm débutent dès la phase de colonisation initiale (James *et al.* 1995). A ce stade intervient un processus simultané : la co-adhésion. En effet, seul un nombre limité de microorganismes peuvent se fixer sur un support "vierge" pour le coloniser, et une fois que ces cellules pionnières ont adhéré, d'autres microorganismes peuvent alors co-adhérer et former ainsi un biofilm multi-spécifique. La seule différence mécanique entre la co-adhésion et la co-agrégation est la disponibilité des sites d'interaction à la surface des cellules. Ils deviennent indisponibles pour la co-adhésion quand leur affinité pour le substratum est maximale et qu'ils s'y adsorbent. Ces cellules pionnières jouent un rôle prépondérant dans l'adhérence du biofilm au substratum car si elles se détachent, c'est la totalité du biofilm qui est arraché (Bussher *et al.* 2000).

I.3.2.2 Accumulation et formation de microcolonies

La deuxième phase de la formation du biofilm est une étape de construction active contemporaine de la production de polymères. Le taux de croissance demeure constant avec une épaisseur de biofilm en constante augmentation. La colonisation a lieu par reproduction

des cellules irréversiblement attachées. Le biofilm s'étend depuis des microcolonies en formant un réseau de polymères. Il est alors possible de maintenir à l'intérieur de cet enchevêtrement de polymères un micro-environnement qui va créer des conditions propices et permettre le maintien d'une certaine homéostasie favorable à la croissance des microorganismes (Stoodley *et al.* 2002). Ainsi, l'échange de nutriments facilité par cette architecture permet à la communauté microbienne du biofilm de se développer en épaisseur, tout en conservant chaque cellule individuellement dans des conditions de croissance et de développement optimales quelle que soit leur localisation au sein du biofilm. (Gonzalez-Gil *et al.* 2001). La croissance du biofilm peut se produire selon trois mécanismes :

- la redistribution de cellules attachées par mouvement actif des cellules (motilité de surface),
- la division binaire des cellules attachées, les cellules filles s'étalent alors de façon à former des grappes de cellules,
- Le recrutement de cellules libres dans le milieu liquide environnant.

La contribution relative de chacun de ces mécanismes est variable. La nature des microorganismes impliqués, les propriétés du support, les conditions hydrodynamiques dans le fermenteur, mais également l'augmentation de la charge appliquée sont des facteurs qui affectent le développement du biofilm (Stoodley *et al.* 2002). La croissance et la structure du biofilm sont largement déterminées par la production d'une matrice composée d'exopolysaccharides. Il a été démontré qu'il existe une relation forte entre la production de polysaccharides et la différenciation structurale du biofilm chez certaines espèces bactériennes (Choi *et al.* 2001; Alison 2002). La sur-expression ou la sous-expression de certains gènes responsables de la synthèse des exopolysaccharides entraînent des modifications structurales du biofilm. Ainsi la surproduction d'exopolysaccharides (majoritairement hydrophiles) induit la formation d'un biofilm épais avec une structure complexe au sein duquel les groupes de cellules adoptent la forme de grappes et de canaux aqueux (Costerton 1999; Sutherland 2001(a); Alison 2002; Stoodley *et al.* 2002). De même, la sous-production d'exopolysaccharides entraîne la formation de biofilms moins complexes mais également plus sensibles aux agents antimicrobiens (Davies *et al.* 1998).

La structure du biofilm est fonction du type de réacteur utilisé et des conditions qui lui sont appliquées. D'après van Loodsrecht *et al.* (van Loosdrecht *et al.* 1995), la croissance de la biomasse attachée se fait par protubérances, et l'augmentation en épaisseur du biofilm est corrélée à l'équilibre entre la charge organique appliquée et l'intensité des contraintes. Il a été

montré que l'activité cellulaire au centre des grappes de cellules diminue quand la taille de ces grappes augmente (Choi *et al.* 2001). L'activité de ces cellules ne pouvant pas augmenter par l'ajout de nutriments ou de sources de carbone directement disponibles, cela semble indiquer qu'elle n'est limitée que par la disponibilité du substrat (Lazarova *et al.* 1995).

1.3.2.3 Maturation du biofilm

Cette troisième phase concerne le biofilm à l'état avancé. Son épaisseur atteint un plateau et les phénomènes de croissances conditionnées par l'accès au substrat sont contrebalancés par les phénomènes de décroissance (respiration endogène) et de détachement dont nous allons détailler les mécanismes.

1.3.2.3.1 Croissance du biofilm et accès au substrat

Dans les systèmes de réactions hétérogènes comme les procédés à biofilm, les réactifs peuvent être transportés d'une phase à une autre (gazeuse, liquide et solide). Le taux de transfert de matière à travers le biofilm peut contrôler le taux global du processus observé ; il est dépendant du régime d'écoulement du fluide et des propriétés du biofilm (van Loosdrecht *et al.* 1995). L'augmentation de la charge en substrat entraîne une augmentation de la quantité de biofilm jusqu'à une valeur limite.

L'épaisseur du biofilm augmente avec l'augmentation de la charge en substrat et le taux de dégradation du substrat augmente en proportion avec la quantité de biomasse accumulée jusqu'à une valeur critique où il demeure constant (Trulear *et al.* 1982; Iwai *et al.* 1994). Ce comportement peut être attribué à la résistance diffusionnelle due à l'augmentation de l'épaisseur du biofilm. En effet, le taux d'enlèvement du substrat est dépendant du transfert de matière qui est généralement contrôlé par la diffusion. Une résistance au transfert relativement importante est susceptible de diminuer la concentration en substrat à travers le biofilm, réduisant le métabolisme des microorganismes présents à l'intérieur du biofilm.

Le taux de transport par diffusion des substrats, des nutriments et des gaz détermine la physiologie des populations à des profondeurs variables de l'épaisseur du biofilm. Ainsi, la diffusion de ces substances à travers le biofilm peut contrôler la croissance des microorganismes enfouis plus profondément dans le biofilm. Les microorganismes se reproduisent à un taux qui est déterminé par leur état physiologique et celui de leur environnement. La capacité d'épuration d'une population spécifique est fonction de la concentration de biomasse présente dans le biofilm. A l'état d'équilibre, la densité de biomasse maximale est fonction de la concentration en substrat limitant présent dans l'effluent

(van Loosdrecht *et al.* 2002). Ainsi, différentes populations microbiennes peuvent résulter de différentes compositions de substrat. Le gradient de concentration généré par la résistance diffusionnelle détermine la distribution d'organismes à travers le biofilm. Le degré de mélange, qui se rapporte à la turbulence dans le voisinage immédiat du biofilm, devient l'élément contrôlant cette étape car il affecte directement l'épaisseur du film stagnant (Characklis *et al.* 1990). Une étude de Brito et Melo (Bruto *et al.* 1999), portant sur l'influence des contraintes hydrodynamiques sur le transfert de matière au sein du biofilm, a montré une relation entre les contraintes hydrodynamiques et les propriétés des biofilms anaérobies. Pour des vitesses de fluide élevées, un meilleur transfert de matière est observé au sein de biofilms en formation mais également au sein de biofilms matures.

I.3.2.3.2 Détachement

Le détachement du biofilm découle de plusieurs phénomènes : l'érosion, la mue et l'abrasion (Turan 2000). Le détachement par érosion se caractérise par la perte de petites sections de biofilm. Trulear et Characklis (Trulear *et al.* 1982) ont observé que ce type de détachement dépend à la fois des conditions dynamiques du fluide qui applique une force de cisaillement à l'interface fluide-biofilm, et des caractéristiques de l'attachement de la biomasse. En effet, l'érosion augmente avec la vitesse du fluide (cisaillement) et avec l'épaisseur du biofilm au-delà d'une limite supérieure de contraintes en détachement (Gjaltema *et al.* 1995). La structure et la composition du biofilm influencent le phénomène d'érosion ; par exemple, Huang et Pinder (Huang *et al.* 1995) ont montré que la présence de calcium ($100 \text{ à } 120 \text{ mg.L}^{-1}$ dans la phase aqueuse) donnait une structure de biofilm capable de limiter l'érosion.

Dans le cas de procédés d'épuration, il faut également noter que la croissance du biofilm entraîne une diminution du volume effectif du bioréacteur, et donc une augmentation de la vitesse de l'écoulement et des forces de cisaillement à l'interface liquide-biofilm, ce qui génère une augmentation de l'incidence de détachement.

Une perte importante du biofilm peut être due à la mue. Ce type de détachement se produit avec les biofilms formés en conditions riches en nutriments, habituellement plus épais et moins denses. Le détachement massif du biofilm génère une perte massive et rapide de la biomasse par lessivage. Une surcharge volumique à l'entrée du réacteur, la présence de substances toxiques, l'augmentation brutale des contraintes physiques ont été suggérées comme des causes probables du détachement massif (Characklis *et al.* 1990).

Le phénomène d'abrasion résulte des chocs de particules sur le biofilm, comme les collisions du support en lits mobiles (Nicollella *et al.* 1997). L'abrasion est dépendante de la géométrie des particules de support, de la fréquence et de l'intensité des chocs entre ces particules (Araki *et al.* 1994). Pour les procédés à lit fluidisé, Gjatelma *et al.* (1997) montrent que le décrochement du biofilm est lié au phénomène d'abrasion, prévenant la formation excessive de biofilm. Dans le cas des réacteurs à support fixe, il est très difficile de contrôler la taille du biofilm en jouant sur l'abrasion. De plus, dans ce type de procédé, le paramètre responsable des forces de détachement est principalement la vitesse du liquide, qui se situe en général entre 1 et 10 mm.s⁻¹, valeurs pour lesquelles le taux de détachement est très bas (Nicollella *et al.* 2000).

D'après l'ordre d'utilisation des substrats, les bactéries acidogènes, qui présentent une croissance rapide, composent majoritairement les couches externes du biofilm (Batstone 1999), tandis que les méthanogènes acétoclastes sont plutôt présentes dans les parties internes et profondes du biofilm (Gonzalez *et al.* (González *et al.* 1992)). L'abrasion a donc pour conséquence de favoriser une activité microbienne des groupes méthanogènes possédant un faible taux de croissance (Batstone *et al.* 2004). Par conséquent, les fortes contraintes physiques des lits mobiles contribuent à l'établissement d'un consortium bactérien plus favorable dans sa composition que d'autres procédés tels que les UASB ou les filtres ascendants. De fortes contraintes sont plus indiquées pour la formation d'un biofilm fin, dense et actif mais elles sont à l'origine d'une phase de démarrage plus lente (Wood *et al.* 1998). Les fortes conditions de mélange observées dans les lits mobiles permettent également de favoriser les transferts entre les cellules et le milieu liquide (Liu *et al.* 2002).

I.3.3 Différenciation phénotypique durant le développement du biofilm

Les avancées récentes des techniques d'investigation *in situ* (microscopie confocale à balayage laser, fluorochromes, micro-électrodes, analyse d'images) ont permis de révéler l'architecture complexe des biofilms (Palmer *et al.* 1999; Araujo *et al.* 2000). Différents travaux ont mis en évidence l'hétérogénéité de cette structure à la micro-échelle, notamment en terme de conditions environnementales (gradients de pH, teneur en composés dissout, osmolarité, etc.) rencontrées par les microorganismes au sein du biofilm mature (Stoodley *et al.* 1997; Costerton *et al.* 2001; Cortizo *et al.* 2003). Le processus de différenciation qui transforme un petit groupe de bactéries adhérentes en une communauté bactérienne incluse dans une matrice formant une couche à la surface d'un solide a été perçu tout d'abord comme une succession de stades morphologiques. Les cellules adhérant individuellement qui vont

initier la formation du biofilm sont entourées d'une faible quantité d'EPS, et sont capables de se mouvoir de façon indépendante, grâce à des cils, flagelles, par glissement, par contraction. L'approche moléculaire a permis de mettre en évidence le rôle de certains de ces organites cellulaires dans cette phase d'adhésion. Ainsi, flagelles (type I, type III, et type IV), pili et fimbriae, curli, pili de conjugaison, mais aussi les phénomènes d'adhésion membranaire vont participer à la formation du biofilm (Davey *et al.* 2000; Hall-Stoodley *et al.* 2002). L'étape d'adhésion irréversible se déroule en même temps que sécrétion par les cellules d'une matrice d'exopolymères. D'autre part, un certain nombre de ces cellules n'ont pas initié la phase de différenciation qui va conduire à la formation du biofilm, et retournent à l'état planctonique. Ceci représente le stade réversible de l'adhésion. Au fur et à mesure de la maturation du biofilm, se met en place la structure cellulaire en grappe et canaux aqueux décrite par la majorité des auteurs (Costerton 1999; Sutherland 2001(a); Alison 2002; Stoodley *et al.* 2002). A ce stade, on observe une différenciation des cellules au sein même du biofilm. Certaines cellules vont adapter leur métabolisme en réponse aux conditions de croissance particulières qui règnent dans leur microenvironnement. D'autres se détachent du biofilm, et retournent à l'état planctonique en laissant libre des cavités qui vont agrandir le réseau de canaux aqueux. On observe également un détachement naturel de microcolonies sans qu'il ne se produise de perturbation du système. Les mécanismes qui sont à l'origine de ce phénomène ne sont pas à ce jour élucidés (Stoodley *et al.* 2002).

On peut également décrire la formation du biofilm comme un processus d'adaptation qui passe par une régulation génétique. Whiteley *et al.* (2001), qui ont comparé grâce à l'utilisation de biopuces à ADN, l'expression génique chez *P. aeruginosa* en culture chemostatée et sous forme de biofilm à la surface d'un lit de graviers immergés, ont mis en évidence des différences d'expression au niveau de 73 gènes entre la population composant le biofilm et les bactéries planctoniques. Prigent-Combaret *et al.* (1999), qui ont passé au crible l'ensemble du génome de *E.coli* K-12, ont mis en évidence que la transcription de 38% des gènes était affectée lors du passage de la forme planctonique à la forme incluse dans un biofilm. D'autres expérimentations, réalisées pour tenter d'isoler les gènes responsables de la formation d'un biofilm de différentes souches bactériennes en culture pure (Wen *et al.* 2002), ont mis en évidence le rôle d'un gène *BrpA* (biofilm regulatory protein) codant pour une protéine de 406 acides aminés nécessaires à la formation d'un biofilm par *Streptococcus mutans*. Les nombreuses différences entre le phénotype des microorganismes en suspension et sous forme de biofilms (les bactéries en biofilms sont particulièrement résistantes aux agressions causées par la dessiccation, les rayons ultraviolets, les biocides, les prédateurs, le

manque de nutriments, etc...) ne peuvent pas être expliquées de façon pleinement satisfaisante simplement par l'attachement et la présence d'une matrice d'exopolymères (Costerton *et al.* 1994). L'hypothèse habituellement suggérée est que les bactéries d'un biofilm ont un métabolisme et une physiologie différents des cellules planctoniques. Le phénotype biofilm serait ainsi génétiquement programmé.

Toutefois, même si de nombreux exemples sont maintenant disponibles pour illustrer les changements phénotypiques qui interviennent lors de la formation du biofilm, il semble difficile de généraliser ces découvertes et d'en tirer un modèle précis de développement. La capacité que les bactéries ont de mesurer leur propre densité et de communiquer entre elles n'est connue que depuis peu de temps. Ce phénomène est appelé «quorum-sensing» ou «signalisation intercellulaire» (Stoodley *et al.* 1999; Hassett *et al.* 2002; Kjelleberg *et al.* 2002). Il permet aux bactéries de se comporter comme une population et non comme des cellules individuelles. Initialement décrite chez *Vibrio fischeri*, la communication intercellulaire a maintenant été décrite pour une multitude de bactéries Gram négatif dont *P. aeruginosa* qui a été le modèle d'étude privilégié (de Kievit *et al.* 2001). Le système est basé sur la production par la bactérie d'une molécule messagère, appelée auto-inducteur, synthétisée par l'enzyme auto-inducteur synthase. Habituellement, chez les Gram négatifs, les signaux intercellulaires sont des molécules basées sur un noyau d'homosérine lactone (HSL) avec une chaîne latérale acyle définissant la spécificité. Cet auto-inducteur est capable de traverser la membrane bactérienne dans les deux sens. Lorsque la densité bactérienne dans le milieu est faible, le message produit par toutes les bactéries se dilue et sa concentration intracellulaire reste basse. Avec l'augmentation de la densité de la population bactérienne, cette concentration croît et atteint un niveau seuil pour lequel le messager est alors capable de se lier à un activateur transcriptionnel spécifique. Cet activateur est inactif sans son auto-inducteur correspondant. Le complexe activateur auto-inducteur se lie alors à des séquences d'ADN spécifiques et augmente la transcription de gènes cibles. Ainsi, l'auto-inducteur permet aux bactéries non seulement de communiquer entre elles (signalisation intercellulaire), mais également de déterminer leur densité (quorum-sensing). L'expression des gènes contrôlés par ce système est activée de manière coordonnée dans toutes les bactéries d'une population en même temps. Ce système leur permet par conséquent de se comporter comme une population et non comme des bactéries isolées (Miller *et al.* 2001).

I.3.4 Composition du biofilm

Une des principales caractéristiques des biofilms est la production d'une matrice extracellulaire qui enveloppe les cellules qui le composent. Cette matrice est majoritairement composée d'eau, et de macromolécules d'origine microbienne qui lui confèrent un arrangement tridimensionnel complexe assimilable à un « micro environnement » pour les cellules résidentes. L'intégrité et la structure même de cette matrice sont influencées par son « macro-environnement », qui va être soumis à de fréquents changements. La matrice peut donc être considérée comme une structure environnementale dynamique (Stoodley *et al.* 2002). Elle peut être abordée comme un amas de bio-polymères d'origine microbienne disposé à l'extérieur et au contact des composés de la membrane des cellules résidentes. Ces bio-polymères extracellulaires ou EPS (Exocellular Polymeric Substances) sont des exopolysaccharides, des acides nucléiques, des protéines, des glycoprotéines et des phospholipides (Alison 2002) (Cf. Tableau I.11). La très grande variabilité des milieux dans lesquels les microorganismes se développent rend très difficile la généralisation de leur structure ou de leur physiologie. La composition de la matrice est donc basée sur une combinaison de facteurs intrinsèques comme le génotype des cellules qui composent le biofilm, et de facteurs extrinsèques tels que l'environnement physico-chimique où croissent ces microorganismes (Wimpeny *et al.* 2000 b). Il est également possible que la matrice de biofilms qualitativement identiques (composé de microorganismes appartenant aux mêmes espèces) varie dans des proportions importantes au niveau de sa composition et de ses propriétés physiques (Alison 2002). La composition de la matrice est influencée par différents processus, en particulier, la sécrétion active de bio-polymères et d'enzymes, le relargage de composés membranaires comme les lipo-polysaccharides, la lyse et l'adsorption cellulaire. De plus, les variations spatiales de la composition du biofilm sont influencées par des phénomènes de transport actif ou passif. Ainsi, les exopolymères produits à un endroit donné du biofilm peuvent être adsorbés ailleurs au sein du biofilm. De même, il faut noter la présence abondante, dans le biofilm, d'enzymes impliqués dans la dégradation des polymères. Ils servent à libérer des polymères de faible poids moléculaire qui vont être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les cellules résidant au sein du biofilm (Alison 2002). On peut également envisager que, dans des biofilms hétérogènes, la présence de nombreuses enzymes différentes puisse avoir pour effet de dégrader ou d'altérer accidentellement des constituants de la matrice, résistants seulement à certains d'entre eux.

L'eau est le constituant majeur du biofilm frais (environ 97% de la masse du biofilm). Elle peut être localisée dans les cellules (encapsulée) ou être présente dans la matrice en tant

que solvant. La présence et la mobilité de l'eau dans la matrice sont liées aux phénomènes de diffusion qui ont lieu au sein du biofilm. Les cellules résidentes représentent seulement 5% de la masse totale du biofilm frais. Les exopolysaccharides, les protéines (enzymes sécrétés, et produits lytiques), ainsi que les acides nucléiques provenant des cellules lysées représentent chacun 1 à 2% de la masse totale du biofilm hydraté (Alison 2002). Il faut toutefois noter que ces compositions ne sont représentatives que pour un instant donné et dans des conditions environnementales précises, et que la composition spécifique d'un biofilm résulte d'un équilibre dynamique. A tout instant, elle va dépendre de la nature et de la proportion des microorganismes, de leur état physiologique, de la nature physico-chimique du milieu environnant, de l'interface sur laquelle le biofilm va se développer, ainsi que des conditions mécaniques auxquelles elle est soumise.

Les EPS

L'abréviation EPS a été utilisée par différents auteurs pour « extra-cellular polymeric substances », « exopolymères » ou « exopolysaccharides », bien que ces derniers ne représentent pas la majeure partie des bio-polymères extracellulaires présents au sein du biofilm. Ici, nous retiendrons l'abréviation EPS pour désigner de façon plus générale les substances polymériques extracellulaires. Ils sont excrétés par les cellules bactériennes au cours de leur croissance (protéines, polysaccharides et lipides...). Leur présence peut résulter d'une lyse cellulaire (exopolymères intracellulaires) ou d'un apport par les eaux usées elles-mêmes (cellulose, acide humique...). Les EPS interviennent comme épurateurs des eaux par élimination des cations métalliques, agents flocculants des boues activées ou substances responsables de l'hydratation des boues (les exopolymères constituent une couche de gel très hydratée qui protège les cellules et qui rend difficile l'élimination de l'eau lors du traitement des boues)(Sponza 2003). Bien que longtemps définis comme des polysaccharides extracellulaires, la plupart des travaux récents reconnaissent que les EPS contiennent également d'autres types de biopolymères.

A l'échelle de la cellule qu'ils entourent, les EPS sont composés, des macromolécules produites et sécrétées par les cellules, des débris cellulaires, ainsi que des produits de l'activité hydrolytique extracellulaire. Il convient également d'ajouter de nombreuses substances adsorbées, comme les polluants organiques ou minéraux ainsi que différents matériaux présents dans le milieu sous forme particulaire (Sponza 2003). Au sein du biofilm, les EPS forment une couche protectrice qui préserve les microorganismes des variations qui peuvent leur être imposées par l'environnement, comme la dessiccation, les valeurs extrêmes

de pH, l'exposition aux solutions salines concentrées, aux biocides, aux fortes pressions. Les cellules au sein d'un tel biofilm peuvent alors croître même dans des conditions environnementales extrêmes. Les EPS sont retrouvés soit étroitement liés entre eux et à la cellule sous la forme d'une capsule, soit liés de façon plus lâche entre eux ou à la cellule, voire sous forme soluble ou colloïdale (Tsuneda *et al.* 2003). Grâce à ses propriétés mécaniques, mais aussi parce qu'elle crée une zone tampon autour de la cellule, la capsule joue un rôle essentiel dans le survie de la cellule bactérienne dans un environnement naturel (Spaeth *et al.* 2000). Dans la littérature, la capsule est décrite comme un organe extracellulaire qui protège les bactéries, mais qui joue également un rôle essentiel dans les mécanismes de la reconnaissance intercellulaire (Mathews *et al.* 1999). La composition des EPS mesurée dépend largement de la méthode d'analyse employée. A ce jour, aucune méthode permettant d'isoler uniquement les EPS sans contamination par des composés d'origine intracellulaire n'a été mise au point. Les données rapportées ici sont extraites des études menées aussi bien sur des biofilms *stricto sensu* que sur des agrégats, que sur des flocs issus de procédés de traitement des eaux.

Les travaux effectués sur les exopolymères montrent que leur composition varie en fonction de la méthode d'extraction employée, selon l'origine et la composition de l'effluent d'alimentation (Bura *et al.* 1998; Durmaz *et al.* 2001), mais également selon les paramètres de fonctionnement du procédé d'épuration. Pour certains auteurs, les substances humiques ainsi que les protéines sont les composés majoritaires des polymères extracellulaires (Tableau I.11). Ainsi, Jahn *et al.* (Jahn *et al.* 1998), en utilisant une résine Dowex pour l'extraction des exopolymères contenus dans un biofilm alimenté par de l'eau usée domestique, trouvent que plus de 40% des exopolymères sont constitués par des protéines. Toutefois, certains auteurs (Flemming *et al.* 2001(a)) trouvent que les polysaccharides constituent le groupe majoritaire des exopolymères contenus dans leurs biofilms.

Tableau I.11: Composition des EPS

Composés	Composition (mg.g de MV ⁻¹)
Protéines	65,6-295
Polysaccharides	8-595
Lipides	7
Substances humiques	12,3-230
Acides nucléiques	5-15

D'après (Palmgren *et al.* 1996; Bura *et al.* 1998; Dignac *et al.* 1998; Jahn *et al.* 1998; Jorand *et al.* 1998; Wingender *et al.* 1999; Flemming *et al.* 2001(a)).

Les polysaccharides sont principalement constitués par des hexoses, des sucres aminés, des pentoses et des acides uroniques. En ce qui concerne les acides nucléiques (ADN et ARN), ils semblent jouer un rôle important pour la cohésion du biofilm : leurs longues chaînes servent de pont entre les cellules (Whitchurch *et al.* 2002). Ces acides nucléiques produits par les bactéries peuvent être l'indice d'une importante lyse cellulaire. Les lipides, quant à eux sont principalement des triglycérides et des acides gras libres insaturés intervenant dans les interactions de type hydrophobe. Une grande partie des protéines présentes dans le biofilm, peuvent être contenues dans la matrice. L'analyse d'un biofilm synthétique homogène de *Pseudomonas aeruginosa* sur gel d'agar révèle que 45,5% des protéines du biofilm ne sont pas d'origine intracellulaire mais proviennent bien de la matrice (Flemming *et al.* 2001(a)).

Enfin, les substances humiques proviennent directement des eaux usées. La conformation tridimensionnelle stable de la matrice, est assurée, d'une part, par une batterie de liaisons de faible énergie, telles que les liaisons de Van der Waals, les liaisons hydrogènes ou les liaisons électrostatiques, existant entre les composants unitaires des EPS. D'autre part, la présence de cations divalents (essentiellement calcium et magnésium), participe également à la stabilité de l'édifice, en créant des ponts entre les chaînes polysaccharidiques, permettant ainsi la formation d'un gel par la matrice. De plus, au niveau des cellules résidentes, il se crée des interactions, entre les composés hydrophobes de la matrice et la surface de ces cellules, ce qui renforce l'ancrage de ces dernières au sein de la matrice (Spaeth *et al.* 2000). Les EPS qui sont responsables de la cohésion entre les microorganismes, sont aussi à l'origine des forces qui permettent l'adhésion du biofilm à la surface du substratum. La quantité d'EPS synthétisés par le biofilm va dépendre de la quantité de substrat carboné disponible d'une part, et d'autre part de la quantité relative de carbone par rapport aux autres éléments dont la carence peut être limitante. La présence de carbone disponible en excès et, en contre partie, une faible quantité d'éléments tels que le potassium, le phosphore ou l'azote peuvent favoriser la production de polysaccharides au détriment de la synthèse protéique. Ainsi, la faible croissance microbienne qui peut être observée dans certains cas est contemporaine d'une forte production des constituants polysaccharidiques de la matrice (Sutherland 2001(b)).

I.3.5 Influence de l'hydrodynamique sur la structure du biofilm

Si la structure du biofilm est influencée par un grand nombre de facteurs biologiques, les paramètres physiques jouent eux aussi un rôle significatif dans la détermination de la structure du biofilm. Lors des phases initiales de la formation du biofilm, les mécanismes

permettant d'amener le microorganisme au contact du support sont l'hydrodynamique, la diffusion brownienne et la sédimentation, la première étant généralement prépondérante en milieu fortement agité tels que les réacteurs fluidisés. L'hydrodynamique influence donc la mise en contact du microorganisme avec le support, siège du développement du biofilm (Stoodley *et al.* 1999). La plupart des expériences de laboratoire sont menées dans des conditions d'écoulement laminaire, sous de faibles contraintes hydrodynamiques et sur des biofilms aérobies (Drury *et al.* 1993; Purevdorj *et al.* 2002; Stoodley *et al.* 2002). La structure des agglomérats cellulaires, sous formes de grappes ou de champignons, forme alors un biofilm qui peut être qualifié d'anisotropique (pas de direction de croissance préférentielle). Mais sous des contraintes hydrodynamiques unidirectionnelles fortes, les agrégats cellulaires s'allongent dans le sens du courant pour former des sortes de banderoles. Ces banderoles (ou serpentins) sont attachées au substratum par leur partie amont ou " tête ", tandis que leur partie aval ou " queue " peut osciller librement dans le courant (Stoodley *et al.* 2002). L'étude de ces serpentins chez *P. aeruginosa* montre que leur partie terminale croît pour former à son extrémité un chapelet composé de cellules uniques mises bout à bout (Purevdorj *et al.* 2002).

Les conditions hydrodynamiques influencent également les propriétés physiques du biofilm, telles que sa densité ou sa force d'adhésion au support. Une étude de Liu et Tay (2002) montre que des biofilms qui croissent sous des contraintes hydrodynamiques fortes sont plus fins et plus denses que de ceux soumis à des contraintes hydrodynamiques moins importantes. Stoodley *et al.* (2002) n'ont pas pu démontrer si cette modification de structure est d'origine génétique (dans ce cas, seules les cellules produisant un réseau d'EPS fortement adhérentes resteraient attachées et pourraient se diviser) ou si elle est déterminée par des mécanismes purement physico-chimiques (dus par exemple à l'alignement des EPS lorsque le biofilm est soumis à une contrainte hydrodynamique unidirectionnelle).

La déformation observée *in situ* sur des biofilms soumis à une contrainte unidirectionnelle normale démontre leurs propriétés viscoélastiques. Ces propriétés semblent être influencées par la présence de cations multivalents. Ces cations ont un rôle sur la structure même de la matrice exopolymères, au sein de laquelle ils créent des liaisons entre ses polymères constitutifs (Flemming *et al.* 2001(a); Sutherland 2001(b); Liu *et al.* 2002). Herbert-Guillou *et al.* (2001) considèrent cependant que le biofilm possède un comportement élastique, quelles que soient les conditions.

En revanche, selon Stoodley *et al.* (2002), le biofilm se comporte de façon élastique lorsqu'il est soumis à une augmentation de la charge hydrodynamique sur une courte période

de temps (quelques secondes), alors qu'il se comporte comme un fluide visqueux s'il est soumis à ce type de contraintes pendant un temps plus long. Ceci peut expliquer l'allongement en filaments du biofilm, observé en chambre d'écoulement par Dunsmore et *al.* (Dunsmore *et al.* 2002). Les grappes de cellules s'allongent selon les lignes de courant, proportionnellement à une contrainte hydrodynamique unidirectionnelle, jusqu'à une valeur seuil au-delà de laquelle le biofilm va se comporter comme un fluide visqueux en adoptant une macrostructure ondulée se déplaçant à la surface du solide sur lequel il croît selon les lignes de courant principales. Ces structures en serpentins et en vaguelettes sont également décrites par Purevdorj et *al.* (2002) qui précisent que le mouvement des grappes de cellules constitutives du biofilm à la surface du solide peut jouer un rôle important dans la dissémination du biofilm sujet à des contraintes hydrodynamiques, comme c'est le cas dans les réacteurs biologiques, objets de notre étude.

A terme, la compréhension de la biomécanique du biofilm devrait permettre de savoir s'il réagit comme une entité globale coordonnée qui organise sa structure de façon active ou si son architecture résulte simplement d'une agrégation cellulaire, modélisée de façon passive par les contraintes physiques et chimiques de son environnement.

Conclusion

L'organisation de la vie au sein des biofilms et leur composition à l'échelle locale (diffusion, gradients de pH, accumulation de métabolites...) dépendent à la fois de la structure et de la dynamique des populations microbiennes, de leur métabolisme, de la structure physique du biofilm, le tout conditionnant les transferts internes et avec le milieu environnant. Cette biologie des systèmes constitue un champ nouveau d'investigation. Son étude nécessite une approche globale pluridisciplinaire faisant intervenir des connaissances en physiologie microbienne, génie des procédés, biologie moléculaire et biochimie.

Une démarche analytique combinant une approche macroscopique du procédé et une approche basée sur les données moléculaires (inventaire et dynamique de l'écosystème microbien) doit permettre de mieux comprendre les interactions entre la physiologie, la dynamique des populations mixtes et les conditions de mise en œuvre dans les bioréacteurs.

I.4 Etude moléculaire des écosystèmes microbiens complexes

I.4.1 Approche moléculaire

La maîtrise de procédés anaérobies passe par une connaissance plus approfondie des processus biologiques et des microorganismes qui les mettent en œuvre. Afin d'identifier les relations structures/fonctions au sein des biofilms, il est nécessaire d'utiliser des outils performants en terme de résolution, de rapidité d'acquisition du signal mais aussi de conditions non invasives d'observation, compatibles avec des études *in vivo*.

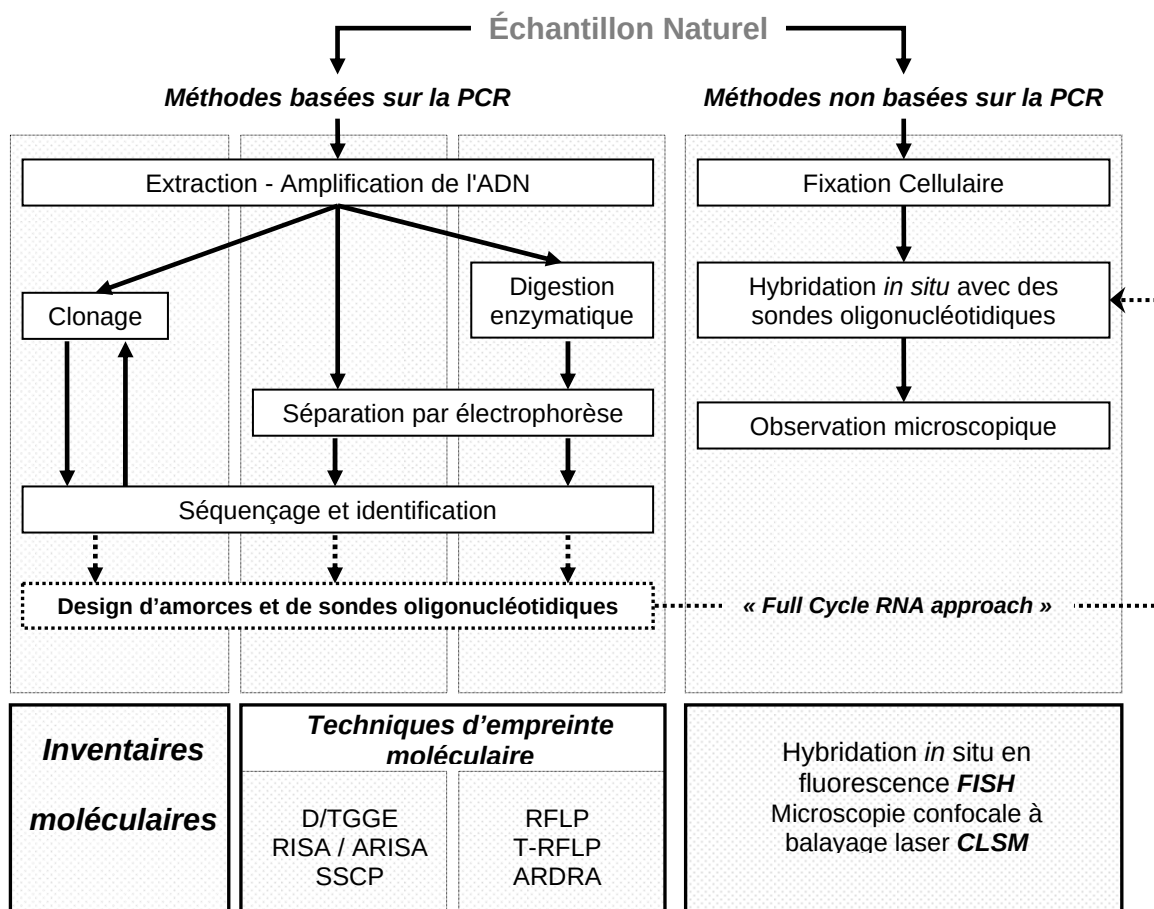


Figure I.18 : Techniques moléculaires pour étudier des échantillons environnementaux et approche « full cycle RNA » (Wilderer *et al.* 2002; Dorigo *et al.* 2005).

Les récentes évolutions de la microbiologie ont permis la renaissance de l'écologie microbienne, définie comme la science étudiant les relations des micro-organismes entre eux et avec leur environnement (Nalin *et al.* 1998), devenue aujourd'hui l'un des domaines clés de l'écologie moderne. Depuis maintenant une quinzaine d'années s'est développé un ensemble d'outils moléculaires qui permet d'étudier la diversité et le comportement des populations microbiennes en s'affranchissant des étapes préalables d'isolement et de culture sur boîte de pétri. Ces techniques s'appuient sur les propriétés des gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) (Hofman-Bang *et*

al. 2003). Elles sont les outils d'investigation privilégiés des systèmes biologiques complexes et font partie intégrante d'une démarche globale que l'on désigne sous le terme « d'approche ARN » (Figure I.18).

I.4.2 Inventaires moléculaires des ADN ribosomiques

Cette approche moléculaire permet d'inventorier et d'identifier les populations présentes dans les écosystèmes microbiens à travers la diversité de leurs génomes. Un ADN "total" est extrait de la communauté microbienne, puis tous les ADNr 16S sont amplifiés en mélange par PCR grâce à des amorces spécifiques. L'isolement de chaque molécule est ensuite réalisé lors de leur "clonage" dans un plasmide d'*E. coli*. Chaque fragment d'ADN cloné est ensuite séquencé. L'analyse des séquences obtenues permet de positionner phylogénétiquement le ou les micro-organismes de l'échantillon par rapport aux organismes connus. Les séquences présentant plus de 97% de similarité sont regroupées dans des unités phylogénétiques appelées Opérational Taxonomy Units (OTU).

Concernant la flore de digesteurs anaérobies, Melvin et Hobson (Melvin *et al.* 1994) ont été les premiers à enrichir les banques de données naissantes avec un petit nombre de séquences obtenues à partir de l'écosystème d'un digesteur anaérobie. Le premier inventaire d'envergure a été réalisé par Godon *et al* (Godon *et al.* 1997a). Parmi les 133 OTUs bactériens identifiés dans un digesteur anaérobie de laboratoire, aucun ne présentait plus de 97 % de similarité de séquence d'ADNr 16S avec les séquences d'organismes cultivés ou non cultivés contenus dans les banques de données. La majorité des OTUs était cependant affiliée à des groupes de bactéries fréquemment isolés à partir des digesteurs, comme les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, Proteobactéries delta ou *Syntrophomonas*, mais 24 % appartenaient à des groupes dont le rôle dans les digesteurs anaérobies est très mal connu, tels que les Spirochetes, les green non-sulfur, les *Planctomyces* ou les Synergistes. Trois des six OTUs appartenant aux *Archaea* étaient affiliés aux genres méthanogènes *Methanosarcina* ou *Methanobacterium*, les trois autres étant affiliés aux groupes des *Crenarchaea* ou des *Thermoplasma*, inhabituels dans les digesteurs mésophiles.

Delbès *et al.* (1998) ont comparé les séquences obtenues lors de cet inventaire moléculaire aux séquences de bactéries anaérobies isolées à partir du même digesteur. La comparaison a montré que la distribution des clones et des isolats dans les groupes bactériens majeurs était similaire, mais aucune bactérie appartenant aux groupes des Spirochetes, des green non-sulfur, des *Planctomyces* ou des Synergistes n'a été isolée avec les milieux de culture utilisés.

A partir d'un digesteur mésophile, Sekiguchi *et al.* (1998) ont obtenu une forte proportion de séquences affiliées au groupe des Proteobactéries delta et proches de bactéries syntrophes ou sulfato-réductrices connues. L'inventaire moléculaire d'un digesteur anaérobie thermophile (55°C) réalisé parallèlement a révélé une diversité globale (richesse) plus faible mais aussi la prédominance de bactéries appartenant aux groupes des *Thermodesulfovibrio*, des bactéries green non-sulfur et des bactéries Gram-positives à bas GC %. La réalisation d'inventaires moléculaires des écosystèmes de digesteurs anaérobies a ainsi permis de mettre en évidence une importante diversité.

I.4.3 Techniques d'empreintes moléculaires

La compréhension du fonctionnement d'un écosystème nécessite un suivi de la diversité dans le temps et l'espace. Pour visualiser des variations de la microflore, la technique des inventaires moléculaires n'est pas adaptée car le nombre de séquences à déterminer pour chaque échantillon est trop important (Dorigoa *et al.* 2005). Des techniques permettant d'obtenir rapidement une image de la microflore de l'écosystème ont donc été développées. Les communautés microbiennes sont représentées par des profils électrophorétiques avec des fragments de tailles et d'intensités variables. Dans un premier temps, elles ont permis de différencier les individus préalablement isolés ou clonés. Ensuite, l'analyse de la globalité de la microflore a pu être accomplie grâce à la réalisation d'empreintes moléculaires de l'écosystème en se basant sur des méthodes d'analyse de mélanges de fragments d'ADN. Toutes ces méthodes sont basées sur une amplification par PCR de l'ADN de l'écosystème. Elles diffèrent par les moyens mis en œuvre pour analyser les produits de PCR obtenus (Dorigoa *et al.* 2005).

On distingue alors deux catégories : les techniques qui séparent les produits de PCR selon leur taille et celles qui les séparent selon leur séquence. Dans la première catégorie, l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ou RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) appliquée aux ADNr est basée sur la variabilité de la taille des fragments d'ADNr digérés par une ou plusieurs endonucléases et analysés par électrophorèse manuelle sur gel (Dorigoa *et al.* 2005). Cette technique est rapide et peu coûteuse. Cependant, elle présente l'inconvénient de créer plusieurs fragments d'ADN par espèce et devient rapidement illisible dans le cas de communautés complexes. Pour pallier ce problème, la T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) utilise une amorce marquée par une molécule fluorescente qui permet la détection d'un seul fragment d'ADNr16S. C'est

généralement l'extrémité terminale 5' du gène de l'ARNr 16S qui est exploitée en raison de la variabilité de taille des régions V1, V2 et V3 (Suzuki *et al.* 1998).

Les méthodes d'ARDRA, RFLP et T-RFLP sont basées sur le principe que les sites de restriction sur l'opéron ARNr sont conservés en fonction des relations phylogénétiques entre espèces (Massol-Deya *et al.* 1995). La méthode de LH-PCR (Length Heterogeneity) différencie les micro-organismes sur la base d'inégalités naturelles de longueur de la séquence de l'ADNr 16S. Dans le cas des techniques RISA (rRNA Intergenic Spacer Analysis) et ARISA (Automated RISA), la discrimination est apportée par la différence de taille de la région intergénique 16S-23S (Fisher *et al.* 1999). L'utilisation d'amorces fluorescentes pour les méthodes de T-RFLP, LH-PCR et ARISA permet la séparation des produits de PCR sur un analyseur génétique (séquenceur automatique) équipé d'un détecteur de type laser. Un standard de taille marqué à l'aide d'un fluorophore différent peut être ajouté aux produits de PCR, digérés ou non, avant leur analyse afin de faciliter l'alignement et la comparaison des échantillons (Liu *et al.* 1997; Osborn *et al.* 2000).

Les techniques d'analyse de fragments d'ADN de type D/TGGE, TTGE et SSCP sont basées sur des différences de mobilité électrophorétique dues à des différences de conformation moléculaire des fragments. Cette conformation dépend elle-même de la séquence nucléotidique propre à chaque fragment d'ADN (Lee *et al.* 1996). Ainsi, des fragments de même taille mais de séquences nucléotidiques différentes peuvent être séparés (Moeseneder *et al.* 1999). Les fragments analysés sont relativement courts (environ 500 pb en T/DGGE et TTGE, et 200 pb en SSCP) car les différences de mobilité se réduisent avec la longueur. Ces méthodes paraissent *a priori* plus discriminantes que les méthodes basées seulement sur l'analyse de la taille des fragments. De plus, elles ne génèrent qu'un fragment d'ADN par espèce microbienne ciblée, ce qui facilite l'analyse dans le cas de communautés microbiennes complexes.

Dans les cas de la D/TGGE (Denaturant/Temperature Gradient Gel Electrophoresis) et de la TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis), l'électrophorèse est réalisée dans un gel d'acrylamide ayant des conditions de dénaturation croissante. Ces conditions de dénaturation sont soit amenées par une concentration croissante d'un agent chimique (urée-formamide pour la DGGE), soit par une température de plus en plus élevée lors de l'électrophorèse (TGGE et TTGE). Les fragments d'ADN, initialement à double brin, migrent en fonction de leur taille jusqu'à rencontrer des conditions qui dénaturent le domaine de fusion le moins stable. Leur migration s'en trouve alors fortement ralentie. La séparation des fragments dépend ainsi de leur température de fusion, et donc de leur séquence

nucléotidique plutôt que de leur taille (Myers *et al.* 1987; Prosser 1993; Muyzer *et al.* 1998). L'identification des espèces correspondant aux fragments d'ADN observés est réalisée par découpage des bandes obtenues dans le gel d'électrophorèse et séquençage.

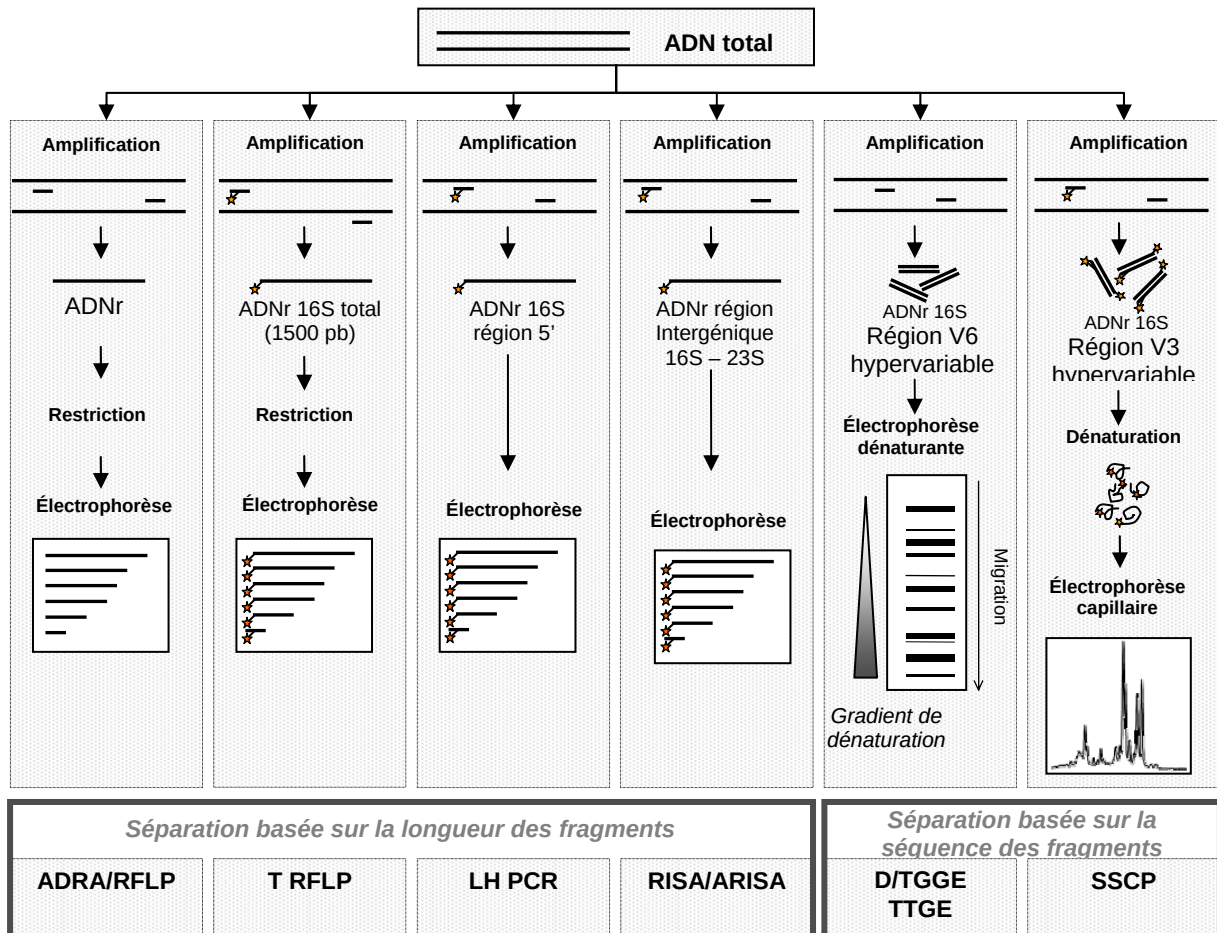


Figure I.19 : Méthodes d'étude moléculaire des écosystèmes complexes basées sur l'amplification par PCR des ADNr microbiens.

La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) diffère en partie de la T/DGGE par ses conditions de migration électrophorétique non dénaturantes. Les produits de PCR sont dénaturés et re-naturés brusquement avant d'être placés sur le gel d'acrylamide. Les molécules simple-brin obtenues adoptent des conformations secondaires stables par appariement au niveau de leurs séquences complémentaires. Ces fragments repliés présentent des différences de mobilité permettant leur séparation lors de l'électrophorèse en gel non dénaturant (Zumstein *et al.* 2000). L'emploi de molécules fluorescentes et d'un séquenceur automatique a permis d'améliorer la détection initialement réalisée avec des sels d'argent. La communauté microbienne apparaît alors sous la forme d'un profil de pics (Zumstein *et al.* 2000). L'identification des pics est réalisée par clonage des produits de PCR, tri des clones

par SSCP et séquençage des clones présentant un pic qui co-migre avec les pics du profil complexe de la communauté microbienne.

Toutes les méthodes d'analyse de fragments ont l'avantage de permettre de comparer de nombreux échantillons. Cette possibilité est notamment exploitée pour l'étude de la dynamique de populations (Dabert *et al.* 2002). D'une manière générale, les méthodes automatisées sur séquenceur comme la T-RFLP et la SSCP sont plus résolutes, en particulier sur les appareils équipés de capillaires, tout en nécessitant une quantité moindre de produits de PCR. D'autre part, la possibilité d'utiliser un standard interne leur confère un avantage certain pour la reproductibilité et la comparaison des résultats (Dabert *et al.* 2002). Enfin, bien qu'utilisées majoritairement pour l'analyse des ADNr, ces techniques ont aussi été adaptées au suivi des ARNr et des gènes de fonction des microorganismes dans le but d'approcher les activités microbiennes des communautés.

Les communautés bactériennes et *Archaea* des granules de réacteurs de type UASB ont été étudiées par DGGE sur ADN et ARN (Santegoeds *et al.* 1999). Les profils issus d'ARNr 16S suggéraient que des syntrophes proches des genres *Syntrophobacter* et *Syntrophomonas* étaient particulièrement actives, tandis que des bactéries affiliées aux genres *Holophaga*, *Clostridium*, *Eubacterium* et *Halobacteroides* étaient également détectées sur le profil d'ADNr 16S. La diversité génétique et l'expression du gène de l'hydrogénase [NiFe] des *Desulfovibrio* dans des digesteurs anaérobies ont été étudiées par DGGE (Wawer *et al.* 1997). L'analyse des profils de DGGE obtenus après amplification par PCR du gène et de l'ARNm correspondant a montré que les espèces présentes, proches de *Desulfovibrio sulfodismutans*, étaient actives lorsque les digesteurs fonctionnaient en conditions méthanogènes mais non en conditions nitrifiantes. Enfin, les travaux de Zumstein *et al.* (2000) ont mis en évidence le potentiel de la méthode de SSCP pour l'étude de l'écosystème des digesteurs anaérobies. Ces travaux ont montré la dynamique constante des populations bactériennes d'un digesteur anaérobie de laboratoire ne subissant pas de perturbation majeure, sur une période de deux ans. La communauté *Archaea* présentait comparativement une diversité plus réduite et une apparente stabilité.

I.4.4 Sondes nucléiques et hybridation

Les sondes nucléiques sont des fragments d'ADN simple brin, marqués à leur extrémité par une molécule rapporteuse fluorescente, radioactive ou enzymatique. Elles sont complémentaires d'un ADN ou d'un ARN cible et sont utilisées en hybridation pour détecter et/ou quantifier leur cible dans un mélange. Le nombre croissant de séquences d'ARNr

disponibles dans les bases de données a permis la construction de sondes complémentaires de nombreux groupes microbiens. Leur spectre de spécificité s'étend du domaine -Eucaryotes, Bactéries, *Archaea*- à celui de l'« espèce » moléculaire. En appliquant une approche intégrative basée sur l'ARNr ou « full cycle rRNA approach » (Wilderer *et al.* 2002) (Figure I.1), et l'utilisation de sondes de spécificité de plus en plus étroite (Amann *et al.* 1995), il est possible de détecter la présence et de quantifier les groupes ou les espèces qui composent une communauté. Des sondes s'hybridant aux ARN ribosomiques et spécifiques de différents groupes phylogénétiques de méthanogènes, de bactéries sulfato-réductrices ou de bactéries syntrophes ont été mises au point.

I.4.4.1.1 Hybridation *dot blot*

L'hybridation des sondes peut avoir lieu sur des ARNr extraits de l'échantillon et fixés sur une membrane. C'est l'hybridation de type " dot-blot " ou " slot-blot ". La sonde est généralement marquée à l'aide d'un radio-isotope (^{32}P ou ^{33}P) (Giovannoni *et al.* 1988) ou d'une substance rapporteuse telle la digoxigénine (Zarda *et al.* 1991). Après hybridation d'une sonde sur une membrane et lavage en conditions stringentes, la quantité de sonde fixée à la membrane est déterminée. En rapportant cette valeur à celle obtenue par hybridation sur la même membrane d'une sonde de référence (généralement une sonde universelle), on peut en déduire la proportion d'ARNr comportant la séquence cible dans l'échantillon de départ. Ce type d'hybridation permet donc d'obtenir des données quantitatives. L'hybridation étant effectuée sur les ARNr microbiens, la proportion obtenue pour une espèce donnée reflète ainsi son niveau d'activité global au sein de l'écosystème. Pour le groupe des bactéries acétogènes, des sondes à ADN (dot blot) hybridant spécifiquement au gène de la formyltetrahydrofolate synthetase, une enzyme clé pour la fixation autotrophe du CO_2 , ont également été développées (Lovell *et al.* 1991).

I.4.4.1.2 Hybridation en fluorescence sur cellules entières (FISH)

Le principe consiste à utiliser les sondes sur un échantillon dont l'intégrité a été conservée afin de pouvoir visualiser « *in situ* » les bactéries hybridées. Pour ce faire, l'échantillon est d'abord stabilisé à l'aide d'un fixateur qui arrête le métabolisme cellulaire tout en conservant les structures des microorganismes. Le paraformaldehyde (PFA) est le fixateur le plus communément utilisé (Amann *et al.* 1995; Hristova *et al.* 2000). Ensuite les cellules sont hybridées sur lames ou en milieu liquide avec des sondes ciblant les ARNr des groupes microbiens considérés. Cette technique initialement développée à l'aide de sondes

radioactives emploie aujourd'hui des sondes fluorescentes (DeLong *et al.* 1989) et a pris le nom de FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization). Seuls les ARNr présents à un nombre de copies par cellule élevé (de 10^3 à 10^5 de copies selon les espèces et leur stade physiologique, (Amann *et al.* 1995)), permettent une visualisation directe de l'hybridation par microscopie à épifluorescence, sans étape d'amplification du signal. La combinaison de sondes de spécificité différente permet de déterminer l'abondance et la distribution spatiale de cellules spécifiques parmi l'ensemble des cellules présentes, par une simple observation microscopique en épifluorescence. Les marqueurs les plus utilisés sont la fluorescéine, la tetramethylrhodamine, le Cy3, et le Cy5 accrochés directement à l'extrémité 5' de la sonde (DeLong *et al.* 1989). L'autofluorescence de certains échantillons peut quelquefois poser des problèmes. Ainsi en digestion anaérobie, la maîtrise de l'autofluorescence des *Archaea* méthanogènes (cofacteurs F420 autofluorescent en lumière U.V.) est indispensable (Brown *et al.* 2001).

En tirant partie d'une part des propriétés des photons (confinement spatial, temporel, couverture spectrale) et d'autre part, des propriétés optiques des systèmes biologiques (absorption, autofluorescence, diffusion, réfraction, anisotropie), différentes techniques d'imagerie non-invasives des milieux vivants par voie optique ont émergé ces dernières années. Parmi elles, la microscopie laser confocale à balayage présente de nombreux avantages. De par son mode de fonctionnement, elle procure une image avec un bruit de fond faible et permet d'observer la structure tridimensionnelle d'échantillons sans découpe physique endommageant les échantillons (Stoodley *et al.* 1999). Elle permet également la détection individuelle ou simultanée de plusieurs composés fluorescents. Les différentes vitesses de balayage offrent la possibilité d'obtenir des images ayant une haute définition (Martín-Cereceda *et al.* 2001). Couplée à la technique FISH, elle semble particulièrement bien adaptée à l'étude des biofilms, car elle permet de visualiser directement les différents groupes de microorganismes marqués et leur arrangement. Ainsi, elle permet d'obtenir simultanément des informations sur l'identité et la localisation des microorganismes, leur proportion dans l'écosystème, voire leur activité métabolique (Batstone *et al.* 2001). L'hybridation *in situ* en fluorescence a permis, par exemple, de mettre en évidence la succession des populations de *Methanosaeta* et de *Methanosarcina* au cours du démarrage d'un digesteur (Raskin *et al.* 1995) ou la dynamique des populations méthanogènes, sulfato-réductrices ou syntrophes en présence ou en absence de sulfate dans des digesteurs anaérobies (Raskin *et al.* 1995; Harmsen *et al.* 1996; Merkel *et al.* 1999) et dans un aquifère alcalin anaérobie (Fry *et al.* 1997). Hansen *et al.* (1999) ont estimé à 0,2 à 1% la présence des bactéries du groupe des

Syntrophomonadaceae dans un digesteur méthanogène mésophile. Sur des granules d'un réacteur où se déroulaient à la fois la méthanogenèse et la sulfato-réduction, Santegoeds *et al.* (Santegoeds *et al.* 1999) ont localisé les bactéries sulfato-réductrices sur une couche externe du granule, tandis que les méthanogènes étaient à l'intérieur. Ils ont également confirmé cette compartimentalisation métabolique à l'aide de micro-électrodes. Parmi les *Archaea*, le genre *Methanosaeta* était majoritaire au sein des granules.

I.4.5 Limitations méthodologiques

L'analyse de la diversité d'une communauté microbienne obtenue à partir des méthodes moléculaires peut être limitée par des biais méthodologiques présents à chaque étape de l'analyse. Pendant l'extraction de l'ADN d'un échantillon, une lyse cellulaire insuffisante ou différentielle peut changer la composition et l'abondance de l'ADN ou de l'ARN d'une espèce dans l'échantillon. La PCR reste toutefois la principale étape incriminée pour des biais liés à :

- la spécificité des amorces : en effet, la séquence des amorces utilisées est déterminée à partir des séquences déjà connues et conditionne la détection de nouvelles séquences (Pace 1997) ;
- l'amplification préférentielle de certaines séquences (Suzuki *et al.* 1996) ;
- la formation de séquences chimériques (Liesack *et al.* 1991) ou l'amplification de micro-organismes contaminants (Tanner *et al.* 1998) ;
- un nombre variable d'opérons ribosomiques *rrn* selon les micro-organismes dans le génome de chaque espèce ou même entre les différentes souches d'une même espèce (Farely *et al.* 1995; Johansen *et al.* 1996).

Ainsi, par comparaison avec les approches culturales, l'amplification par PCR favoriserait la détection des populations majoritaires des communautés microbiennes (Nüsslein *et al.* 1999), tandis que les espèces isolées par enrichissement peuvent être en très faible densité réelle dans la communauté (Ward *et al.* 1998). Inversement, les biais d'hybridation des amorces ou une lyse cellulaire insuffisante peuvent empêcher la détection de populations pourtant majoritaires dans l'écosystème (Felske *et al.* 1998). Les longues amorces nécessaires en DGGE peuvent causer des biais supplémentaires au cours de l'étape d'hybridation de la PCR (Lee *et al.* 1996; Clapp 1999). En ce qui concerne les méthodes d'empreintes moléculaires, de nombreux facteurs tendent à diminuer la diversité apparente des communautés. Le nombre et l'intensité des bandes (ou hauteur de pics) peuvent ne pas

égaler le nombre et l'abondance des espèces de la communauté microbienne : pour certains groupes phylogénétiques de bactéries, la séquence de l'ADNr 16S n'est pas discriminante et il n'est pas exclu que les bandes correspondant à deux espèces différentes se chevauchent. Dans les communautés complexes, les séquences les moins abondantes ne sont pas suffisamment amplifiées par la PCR pour être visibles sur les électrophorégrammes. Inversement, certains biais peuvent conduire à l'apparition de plusieurs bandes lors de l'analyse d'une souche et conduire à une sur estimation de la diversité de l'écosystème. Les bandes supplémentaires peuvent provenir :

- i) de l'existence de plusieurs conformations pour une seule séquence,
- ii) de la présence d'au moins deux opérons dans une même souche,
- iii) de la reconstitution de doubles brins (homoduplex ou hétéroduplex).

Des étapes de clonage et de séquençage des ADNr 16S observés restent donc nécessaires pour identifier les micro-organismes correspondants aux bandes d'électrophorèse et pour détecter les séquences sous-dominantes de l'environnement (Cho *et al.* 2000). Le nombre total de clones analysés est également primordial pour une bonne représentativité de la diversité microbienne de l'environnement (Dunbar *et al.* 1999).

Enfin, un dernier biais réside dans l'utilisation de l'ADN comme marqueur génétique. En effet, la présence d'un ADN ne permet pas de déterminer si le micro-organisme correspondant est réellement actif dans l'écosystème ou s'il est en transit ou en apoptose. Les techniques ciblant les ARNr peuvent alors être privilégiées.

A cause de cette longue liste de biais, de nombreux auteurs favorisent l'approche par hybridation plutôt que les approches par PCR. Ainsi, des différences sur le plan quantitatif ont été fréquemment observées entre des résultats par FISH et la composition de banques de clones issues d'amplification par PCR. Les méthodes d'hybridation permettent de s'affranchir des biais liés à l'utilisation de la PCR mais elles introduisent également des biais :

- faible perméabilité des cellules fixées,
- faible signal lié au faible taux d'ARN cellulaire (DeLong *et al.* 1989),
- problèmes d'autofluorescence en FISH,
- spécificité des sondes : comme pour les amorces utilisées pour les amplifications par PCR, la valeur des sondes dépend du nombre de séquences disponibles et à partir desquelles les sondes sont choisies,
- problèmes d'interprétation du signal et du traitement de l'image.

Les limitations techniques actuelles ne permettent de visualiser que 4 couleurs de marquage et réduisent ainsi considérablement le nombre de populations microbiennes qui peuvent être suivies en simultané. L'hybridation ne peut donc pas se suffire à elle-même pour identifier les espèces présentes dans un écosystème car elle est limitée au spectre de spécificité des sondes choisies. Même la technique nouvelle des puces à ADN (Guschin *et al.* 1997) qui permet pourtant de tester l'hybridation avec un très grand nombre de sondes en une seule étape permet de trouver uniquement ce que l'on cherche.

I.5 Conclusions de l'analyse bibliographique

Il apparaît que la digestion anaérobie est un procédé adapté pour le traitement des effluents des IAA. Les procédés intensifs mettant en œuvre des granules ou des biomasses fixées semblent s'imposer avec toutefois un verrou technique, traduisant également des lacunes scientifiques, au niveau de leur durée de démarrage. Si quelques études ont été réalisées pour analyser l'influence de l'hydrodynamique sur le fonctionnement des réacteurs à biomasse fixée, très peu concernent la phase de démarrage. Par ailleurs, les stratégies de démarrage relèvent le plus souvent d'une approche empirique basée sur l'expérience et non sur l'expérimentation.

A l'échelle des microorganismes, la majorité des travaux destinés à caractériser l'étape de formation par les biofilms sont menés en culture pure et le plus souvent en conditions anaérobies. Les travaux sur la digestion anaérobie sont menés majoritairement sur les réacteurs à granules de type UASB et, malgré les potentialités attendues, peu d'études portent sur les procédés anaérobies à biofilm.

Nous proposons ainsi d'étudier le démarrage de réacteurs à biomasse fixée selon une approche pluridisciplinaire permettant de relier hydrodynamique et les stratégies de démarrage avec la caractérisation du biofilm (mise en place, développement, écologie microbienne) et les performances des réacteurs de dépollution.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1 Dispositifs expérimentaux.....	95
II.1.1 Les réacteurs à Lit Turbulé Inverse (LTI)	95
II.1.2 Le réacteur à lit fixe ascendant (LF)	101
II.2 Stratégies de démarrage et de montée en charge.....	103
II.2.1 Stratégie A : stratégie de l'épuration maximale	104
II.2.2 Stratégie B : stratégie de la charge maximale.....	104
II.2.3 Stratégie C : Augmentation exponentielle de la charge volumique appliquée	107
II.3 Suivi des réacteurs et méthodes analytiques associées	108
II.3.1 Suivi analytique hors ligne	109
II.3.2 Méthodes de suivi et instrumentation en ligne	114
II.3.3 Bilans massiques.....	115
II.3.4 Définition de paramètres et calculs.....	117
II.4 Techniques de biologie moléculaire	117
II.4.1 Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence	117
II.4.2 Observations microscopiques	119
II.4.3 Caractérisation et suivi moléculaire de la flore des digesteurs	122

La première phase de l'étude a été menée sur des réacteurs à Lit Turbulé Inverse (LTI) de laboratoire. Le suivi simultané de deux réacteurs nous a permis d'analyser l'influence de stratégies de montée en charge sur la mise en place et la maturation d'un biofilm anaérobie et la dynamique des populations. Les stratégies sont basées sur différents paramètres tels que la durée de la phase d'inoculation, les contraintes hydrodynamiques (imposées par la vitesse de recirculation du gaz), le paramètre de contrôle de la montée en charge et le temps de séjour hydraulique. Lors d'une seconde phase expérimentale, nous avons pu extrapoler certaines des stratégies sélectionnées à l'échelle pilote sur un réacteur préindustriel (1m³) à lit fixe orienté (LF) alimenté en flux ascendant par un effluent réel.

II.1 Dispositifs expérimentaux

II.1.1 Les réacteurs à Lit Turbulé Inverse (LTI)

II.1.1.1 Les réacteurs

Les deux réacteurs à lit turbulent inverse utilisés lors de la première phase de l'étude sont identiques. Le schéma du dispositif expérimental est présenté à la Figure II.1. Le Tableau 1 détaille les principales caractéristiques géométriques et les paramètres opératoires des LTI. Fabriqués en PVC, ils possèdent une double enveloppe thermostatée afin de maintenir une température du milieu réactionnel proche de 37°C. L'alimentation de l'effluent est réalisée en continu par le haut (flux descendant). Le liquide est évacué depuis le bas du réacteur par une surverse qui maintient un niveau constant dans le réacteur. Une boucle de recirculation liquide permet la mesure et la régulation du pH. La recirculation partielle du gaz à la base de la colonne est assurée par un injecteur : il s'agit d'un tube en PVC de 12 cm de long, percé de 10 trous de 0,5 mm de diamètre. La répartition des bulles (0,4 à 0,7 cm) sur la longueur de l'injecteur est variable en fonction de la vitesse de gaz (U_g) appliquée. La partie supérieure du réacteur est constituée d'un séparateur qui permet l'évacuation du gaz et assure le maintien du support dans le réacteur lors de la fluidisation du support après une phase d'arrêt. Une zone conique à la base du réacteur permet la décantation gravitaire de la biomasse libre inoculée ou détachée. Trois points de prélèvement sont repartis sur la hauteur du réacteur.

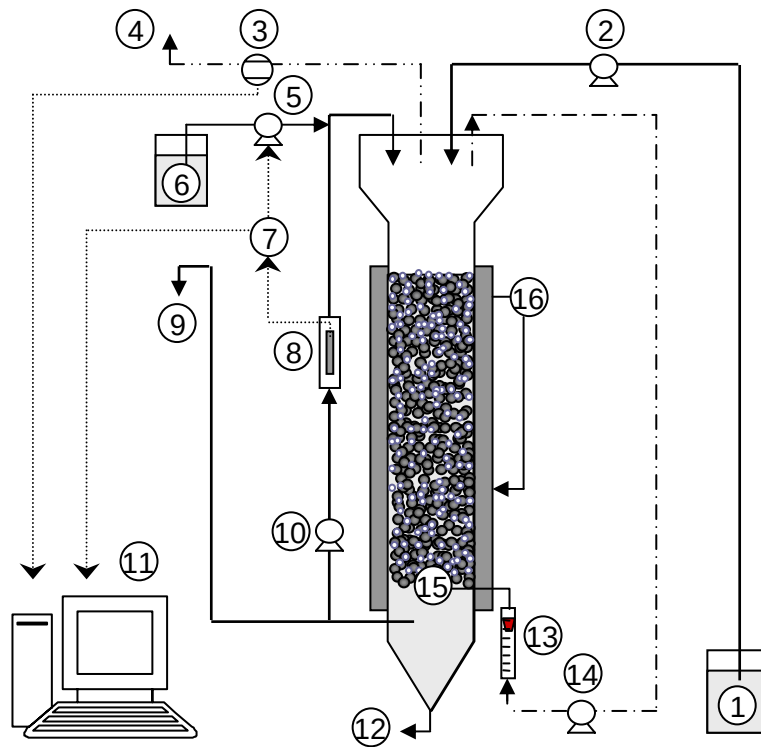


Figure II.1 : Schéma synoptique des LTI

(1) bac d'alimentation, (2) pompe d'alimentation, (3) compteur à gaz, (4) sortie de biogaz, (5) pompe de régulation du pH, (6) bac de soude, (7) pH-mètre, (8) sonde pH, (9) sortie liquide, (10) pompe de recirculation du liquide, (11) acquisition et stockage des données, (12) sortie du décanteur, (13) débitmètre à gaz, (14) pompe de recirculation du biogaz, (15) injecteur de gaz, (16) thermostat.

Tableau II.1 : Caractéristiques des LTI et paramètres opératoires

Volume utile du réacteur (L)	7,24
Volume du décanteur (L)	4
Volume du séparateur gaz – liquide – solide (L)	9,59
Volume total du réacteur (L)	20,83
Hauteur du lit fluidisé (m)	0,64
Section (m ²)	1,131.10 ⁻²
Débit de recirculation liquide (L.h ⁻¹)	7,5
Temps de séjour hydraulique (TSH) (j)	Variable*
Volume apparent du lit statique non tassé (L)	1,5
Volume solide spécifique du lit de particules (L)	0,9
Taux de remplissage solide (%)	24,3
Fraction solide en lit statique (ε_{so})	0,1337

	Faibles contraintes hydrodynamiques	Fortes contraintes hydrodynamiques
Vitesse de gaz (Ug en mm.s ⁻¹)	1mm.s ⁻¹	10mm.s ⁻¹
Rétention liquide (ε_l)	0,7366	0,6966
Rétention gazeuse (ε_g)	0,0234	0,0625
Rétention solide (ε_s)	0.24	0.2409

* Cf. § II.2

II.1.1.2 Le support

Le support utilisé est commercialisé par la société Omega Minerals (Hambourg, Allemagne), sous le nom commercial de U-Spheres™. C'est un support particulaire flottant, composé de microsphères de céramique non poreuses, creuses, de couleur grise. C'est un sous produit de la combustion du coke dans les centrales thermiques, sa taille et sa forme sont donc des paramètres physiques irréguliers. L'épaisseur de la coque de céramique est en moyenne égale à 10% du rayon. La température de fusion est de 1200-1350°C. Le gaz enfermé dans la sphère est composé à 70% de CO₂ et 30% de N₂. Le taux de vide non tassé (ϵ_o) est de 0,4, ce qui signifie que la fraction de solide en lit statique (ϵ_{so}) est de 0,6.

La composition chimique du support indiquée par le fournisseur est reportée dans le Tableau 2. Le support n'est pas biodégradable et il ne contient pas de composés pouvant être libérés et interférés avec le milieu à traiter. Il possède une bonne résistance mécanique (2000 bars) permettant de résister à l'abrasion due aux chocs entre particules ou contre les parois du réacteur. Sa neutralité chimique permet la mise en application de différents protocoles de mesures détaillés lors des chapitres suivants.

Tableau II.2 : Composition chimique du support U-Spheres™

Composés chimiques	Composition du support (% massique)
Silice (SiO ₂)	55-60%
Alumine (Al ₂ O ₃)	25-30%
Fer (Fe ₂ O ₃)	4-10%
Calcium (CaO)	0,2-0,6%
Magnésium (MgO)	1-2%
Alcalin (Na ₂ O, K ₂ O)	0,5-4%

Les caractéristiques générales du support ont été déterminées (Cf. Tableau II.3). La répartition granulométrique a été mesurée à l'aide d'un granulomètre laser, décrit plus loin. Le diamètre moyen de l'ensemble des particules (diamètre de Sauter) est calculé à partir de la fraction volumique (X_i) du support selon la formule suivante :

$$\overline{dp}_{eq} = \sum_{i=1}^N \frac{X_i}{\overline{dp}_i} \quad (1)$$

La gamme de variations s'étend de 10 à 490µm, avec un diamètre équivalent moyen égal à 132,5 µm pour le support brut.

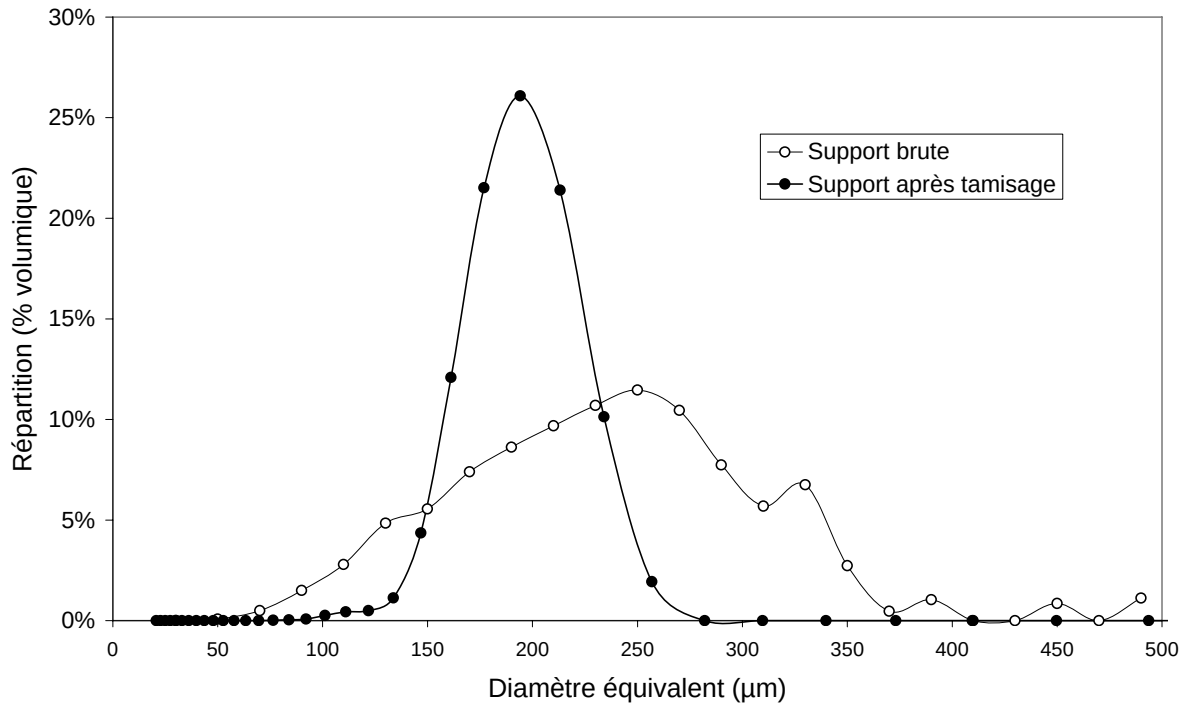


Figure II.2 : Répartition d'un échantillon de 2260 particules de U-Spheres™ non tamisé (brute) par classe de diamètre équivalent et après tamisage

Un tri granulométrique par tamisage est réalisé afin d'homogénéiser la taille des particules et de séparer les impuretés, présentes en majorité sous forme d'oxydes métalliques. Nous avons opté pour des tamis ayant des seuils de coupure respectifs de 160 et 224 μm , afin de retenir une fraction du support représentant 39,3% du volume total d'un échantillon brut de U-Spheres™. La répartition granulométrique du support U-Spheres™ après tamisage est présentée également sur la Figure II.2. Le diamètre moyen des particules est égal à 192 μm . Les particules de U-Spheres™ peuvent être assimilées à des sphères et l'aire spécifique (a_g) réelle du support non tassé après tamisage peut être calculée à partir du $\overline{dp}_{eq}$ selon la relation suivante :

$$a_g = \frac{6}{\overline{dp}_{eq}} \times \varepsilon_{so} \quad \text{Surface par volume de support} \quad (2)$$

L'aire spécifique est égale à 18,75 $\text{m}^2.\text{L}^{-1}$ de support (calculée à partir du diamètre moyen). La masse volumique apparente (ρ_{aps}) de 416 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ du support est déterminée par la mesure de la masse sèche de différents volumes de support au repos non tassé. La masse volumique réelle (ρ_s), calculée d'après le taux vide non tassé du support de 0,4, est égale à 696 $\text{g}.\text{L}^{-1}$.

Tableau II.3 : Caractéristiques générales du support U-Spheres™ utilisé dans les LTI.

Nom commercial	U-Spheres™
Fournisseur (pays)	Omega Minerals (Hambourg, Allemagne)
Taille moyenne (dp_{eq} moyen)	192 μm
Fraction de vide en lit statique non tassé (ϵ_o)	0,4
Fraction de solide en lit statique non tassé (ϵ_{so})	0,6
Aire spécifique réelle (a_g)	18,75 $m^2.L^{-1}$ de support
Masse volumique apparente (ρ_{aps})	400 $g.L^{-1}$
Masse volumique réelle (ρ_s)	666,6 $g.L^{-1}$

II.1.1.3 L'effluent

Durant toute cette phase de l'étude, nous avons utilisé un effluent à base de vin dilué pour obtenir la concentration en carbone organique recherchée. Cette solution a été complétée en azote et phosphore (ajout en proportion d'hydrogénophosphate d'ammonium et de chlorure d'ammonium) afin d'obtenir un rapport C/N/P optimal égal à 400/7/1. Ce type d'effluent a été choisi car il présente plusieurs avantages :

- la quasi-totalité (100% à l'erreur de mesure près) de la matière organique biodégradable est sous forme d'éthanol dont les intermédiaires métaboliques de dégradation sont connus et facilement quantifiables,
- il est facilement biodégradable, ce qui permet d'obtenir une réponse réactionnelle rapide lors de tests de cinétique de production de biogaz en réponse à un « pulse » d'éthanol,
- il est semi-synthétique, ce qui permet de maîtriser les principaux paramètres de sa composition pendant toute la durée de l'étude.

Une analyse ICP (Inductively Coupled Plasma) AES (Atomic Emission Spectrometry) a permis de définir la concentration de l'alimentation en éléments traces métalliques. Les résultats de ces analyses pour une solution de vin dilué au 1/10^{ème} dont la DCO est égale à 20 $g_{O_2}.L^{-1}$ sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau II.4 : Composition en éléments traces pour une solution de vin dilué au 1/10^{ème} dont la DCO est égale à 20 g_{DCO}.L⁻¹

Elément	Concentration (µg.L ⁻¹)
Strontium	70.95
Aluminium	98
Molybdène	<1
Titane	3.9
Fer	263
Cuivre	11.4
Zinc	61.1
Manganèse	67.6
Bore	425.7
Baryum	9.6
Argent	<1
Cobalt	<1
Arsenic	2.56
Cadmium	0.13
Crome	14.67
Etain	30.1
Nickel	1.68
Plomb	2.34
Sélénium	<1

Tableau II.5 : Composition de la solution destinée à la complémentation de l'alimentation en éléments métalliques

Elément	Concentration (g.L ⁻¹)
Bore	0.858
Baryum	1.61
Cobalt	1.75
Nickel	6.498
Fer	9.925
Aluminium	11.25
Manganèse	12.71
Zinc	14.873
Strontium	18.331
Cuivre	20.215

II.1.1.4 L'inoculation

L'inoculum utilisé pour l'ensemencement des LTI lors des différents démarrages provenait d'un réacteur anaérobie à biomasse fixée de type lit fixe orienté de 1m³ traitant des vinasses de vin. Avant chaque inoculation, des tests en fioles (thermostatées à 37°C, sous agitation magnétique), ont permis de caractériser l'activité des inocula. Une série de trois injections d'éthanol (95% vol.) a été effectuée afin d'obtenir une concentration dans le milieu de 1g_{CDO}.L⁻¹. Les activités spécifiques reportées dans le Tableau II.6 sont issues des données obtenues lors de la troisième injection. Chaque réacteur a ensuite étéensemencé avec trois litres de boues prélevés sur le volume d'inoculum ayant servi pour la mesure de l'activité spécifique.

Tableau II.6 : Activité de l'inoculum et quantité de biomasse utilisée pour l'inoculation des LTI

	Activité spécifique mesurée (g _{DCO} dég.g _{MVS} ⁻¹ .j ⁻¹)	Quantité de biomasse inoculée (g _{MVS} .L ⁻¹)
Etude hydrodynamique	0,15	13,5
Stratégies A et B	0,11	16,7
Stratégies C ₁ et C ₂	0,21	14,3

II.1.2 Le réacteur à lit fixe ascendant (LF)

II.1.2.1 *Le réacteur*

Le réacteur est un digesteur anaérobie à lit fixe orienté, à flux ascendant présent au laboratoire depuis une dizaine d'années (Steyer et al. 2002). Ce pilote, dont le synoptique est présenté à la Figure 4, est constitué d'un réacteur formé par une colonne circulaire d'une hauteur de 3,5 m et d'un diamètre de 0,6 m, soit un volume total de 982 litres. Le digesteur est équipé d'un système de dilution en entrée du réacteur afin de faire varier la concentration en carbone. Une régulation du pH de l'alimentation s'effectue par apport de soude (NaOH) à 50 % grâce à un régulateur intégré au pH-mètre qui actionne une pompe doseuse à partir d'une consigne prédéfinie. Une pompe péristaltique pilotable à débit variable assure l'alimentation du réacteur. L'alimentation est mélangée au liquide recyclé avant de pénétrer à la base du réacteur où il est homogénéisé par une pompe de mélange. Une fois dans le réacteur, le liquide passe au niveau de la zone réactionnelle jusqu'à la sortie qui s'effectue par surverse. A ce niveau, un séparateur permet le dégazage du milieu liquide et la recirculation de la phase liquide. La régulation de température à une valeur de 35°C s'effectue grâce à une double enveloppe placée à la base du réacteur, dont le fluide est chauffé par une résistance électrique. La recirculation est assurée par une pompe centrifuge à un débit constant de 600 L.h⁻¹ garantissant un bon mélange de la phase liquide du réacteur, ainsi qu'une régulation correcte de la température.

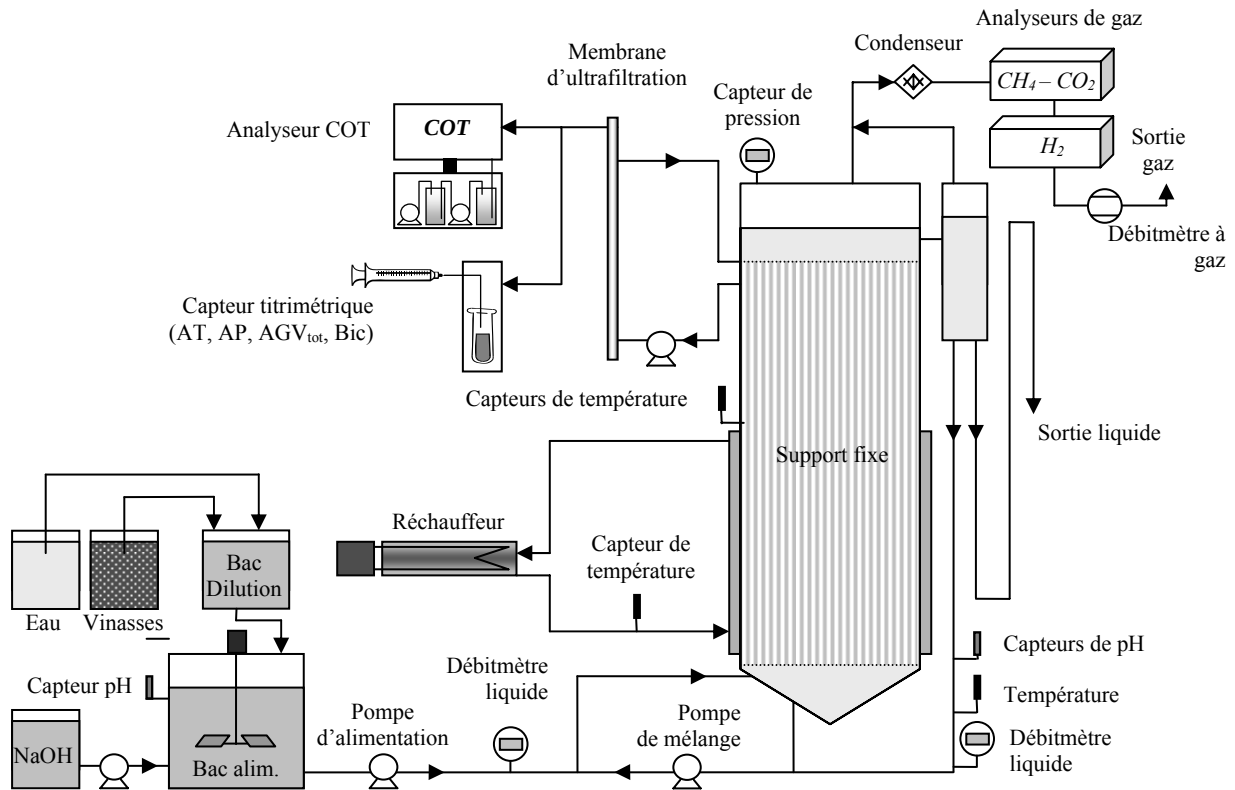


Figure II.3 : Schéma synoptique du réacteur pilote à lit fixe

II.1.2.2 Le support

Le support utilisé est du Cloisonyle™, garnissage ordonné généralement utilisé pour les lits bactériens traitant des eaux résiduaires en conditions aérobies. Il s'agit d'un profilé tubulaire multicanaux en PVC (Figure II.4) qui offre une surface spécifique de $180 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$.



Figure II.4 : Support de type Cloisonyle™ non colonisé

Quinze tubes de 0,1m de diamètre et de 3,2m de long sont disposés verticalement dans l'enceinte du réacteur. Le support occupe un volume d'environ 33,7 litres. Le volume utile du réacteur garni avec ce support est donc égal à 948 litres.

II.1.2.3 L'effluent

Les vinasses de vin utilisées sont des sous produits de la distillation de vin pour produire des alcools. Les caractéristiques de cet effluent varient suivant les lots et les conditions de stockage. Les gammes de variation des principaux paramètres mesurés sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.7 : Mesure et gamme de concentrations des principaux paramètres des vinasses de distillerie

Composés	Concentration	Unité
Acides Gras Volatils (AGV)	2,00 – 16,5	g.L ⁻¹
Demande Chimique en Oxygène Totale (DCOt)	9,00 – 45,0	g.L ⁻¹
Demande Chimique en Oxygène Soluble (DCOs)	7,00 – 40,0	g.L ⁻¹
Matières En Suspension (MES)	2,40 – 7,80	g.L ⁻¹
Matières Volatiles en Suspension (MVS)	1,20 – 4,90	g.L ⁻¹
Alcalinité Totale (AT) ou Partielle(AP)	30,0 – 80,0	meq.L ⁻¹

Le rapport entre la DCO et le COT se situe entre 2,8 et 3,3 suivant les vinasses. La concentration maximale mesurée en acides gras volatils (AGV) est égale à 16,5 g_{DCO}.L⁻¹ avec des proportions de 1, 0,5, 0,3, 0,25, respectivement pour les acides acétique, propionique, butyrique et valérique. Le pH des vinasses pures est proche de 4.

II.1.2.4 L'inoculum

L'inoculum utilisé pour l'ensemencement du LF lors des différents démarrages provient de réacteurs anaérobies à biomasse fixée de type biofiltre ascendant traitant des vinasses de vin. Il faut noter que l'inoculum utilisé lors des deux derniers démarrages est constitué de la biomasse libre recueillie à la sortie de ce même réacteur au cours de la session expérimentale précédente et conservée à cet effet. Les quantités ainsi que l'activité de cet inoculum sont reportées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.8 : Activité et quantité de biomasse utilisée pour l'inoculation des LF

	Activité spécifique mesurée (g _{DCO} dég.g _{MVS} ⁻¹ .j ⁻¹)	Quantité de biomasse inoculée (g _{MVS} .L ⁻¹)
Stratégie C ₁₁	0,15	6,8
Stratégie C ₁₂	0,21	14,3

II.2 Stratégies de démarrage et de montée en charge

D'un point de vue opérationnel, le démarrage correspond au temps nécessaire pour amener le réacteur à sa charge nominale avec une efficacité d'épuration conforme aux

spécifications souhaitées. L'objectif étant d'augmenter la charge volumique appliquée (CVA, définie selon l'équation (3)) le plus rapidement possible, sans inhiber l'écosystème.

$$CVA = \frac{DCO_{in} \times Q}{V_u} \quad \text{en } g_{DCO} \cdot L^{-1} \cdot j^{-1} \quad (3)$$

DCO_{in} : DCO de l'alimentation ($g_{DCO} \cdot L^{-1}$).

Pour un réacteur donné, selon l'équation (3), l'augmentation de la CVA peut être réalisée selon deux approches différentes : soit par une augmentation de la DCO de l'alimentation avec un temps de séjour hydraulique défini selon l'équation (4) constant, soit par une diminution du TSH à DCO constante dans l'alimentation (effluent non dilué).

$$TSH = \frac{V_u}{Q} \quad \text{en } jour^{-1} \quad (4)$$

V_u : volume utile du réacteur (L)

Q : le débit d'alimentation (en $L \cdot j^{-1}$)

Trois types de montée en charge ont été testées pour le démarrage des différents réacteurs.

II.2.1 Stratégie A : stratégie de l'épuration maximale

Basée sur la mesure de la DCO dégradée (DCO_{deg} définie selon l'équation (5)), cette stratégie conventionnelle consiste à augmenter graduellement l'apport en matière organique tout en conservant un rendement épuratoire (Y_{ep} , équation (6)) suffisamment élevé.

$$DCO_{deg} = DCO_{in} - DCO_{out} \quad \text{en } g_{DCO} \cdot L^{-1} \cdot j^{-1} \quad (5)$$

$$Y_{ep} = \frac{DCO_{in} - DCO_{out}}{DCO_{in}} \times 100 \quad \text{en } \% \quad (6)$$

DCO_{in} : DCO de l'alimentation ($g_{DCO} \cdot L^{-1}$),

DCO_{out} : DCO en sortie de réacteur ($g_{DCO} \cdot L^{-1}$)

La montée en charge s'effectue par paliers en fonction des capacités épuratoires. Dans notre cas, la charge est augmentée lorsque le rendement épuratoire atteint une valeur seuil de 80%.

II.2.2 Stratégie B : stratégie de la charge maximale

Cette stratégie de contrôle de la montée en charge, plus agressive, consiste à augmenter la charge tant que les microorganismes sont capables de dégrader les composés apportés, c'est à dire que $Q \cdot DCO_{deg}$ augmente (ce qui n'implique pas que Y_{ep} augmente). La

capacité de dégradation du consortium méthanogène est évaluée en mesurant l'impact d'une augmentation transitoire de la CVA sur le débit de biogaz (Figure II.5) d'après les travaux de Steyer et al. (1999). En cas d'un impact négatif, c'est à dire lorsque la perturbation induit une surcharge du réacteur, impliquant une stagnation ou une diminution du débit de biogaz, la CVA est diminuée. Dans le cas d'un effet positif de la perturbation, (Cf. Figure II.6), la CVA est augmentée.

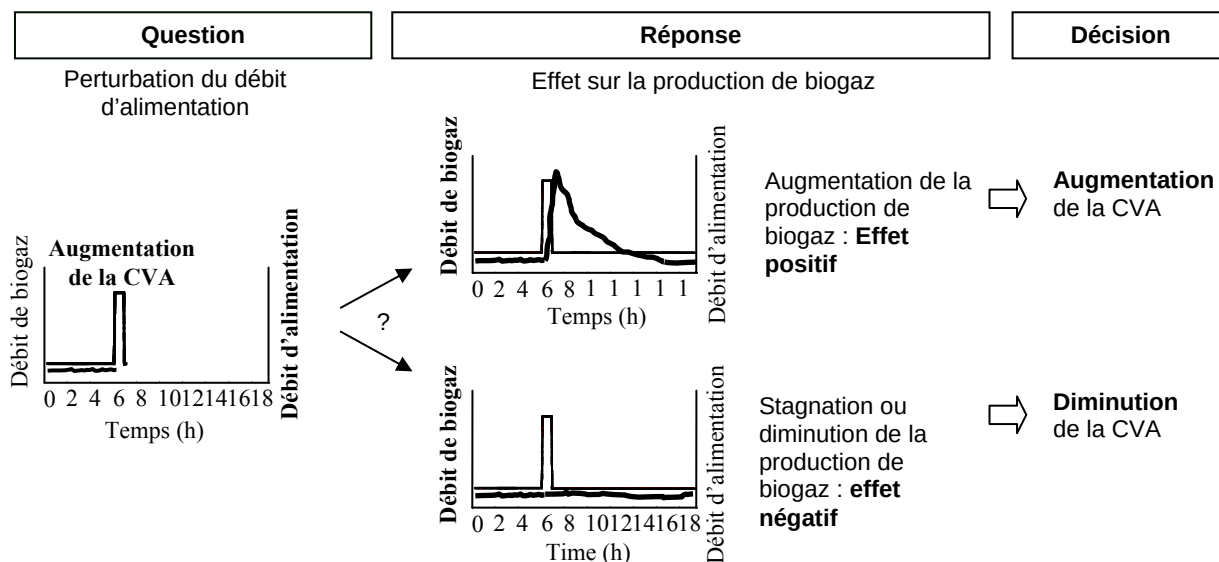


Figure II.5 : Représentation schématique de la stratégie de la charge maximale

Le protocole établi pour décider de l'augmentation, du maintien ou de la diminution de la CVA est maintenant détaillé. A l'état d'équilibre, on suppose qu'un débit d'alimentation constant (Q_1) induit un débit de biogaz donné (noté $Q_{gaz,av.pulse}$). Une impulsion de la CVA est réalisée via l'augmentation du débit liquide d'un facteur α pendant un temps Δt . Si la concentration de l'effluent en carbone organique reste stable et que l'activité des microorganismes est maintenue, le volume théorique de gaz produit doit être égal à :

$$V_{théorique} = \Delta t \times Q_{gaz,av.pulse} \times \left(\frac{\alpha Q_1 - Q_1}{Q_1} \right) \quad (7)$$

La mesure de ce volume théorique nécessite une mesure du débit de biogaz sur un temps très long. Ainsi, nous proposons de mesurer un volume de biogaz V_{mesure} de la manière suivante : suite à la perturbation, la courbe représentant le débit de biogaz en fonction du temps est intégrée jusqu'à ce que le débit instantané de biogaz soit inférieur à sa moyenne mobile calculée sur un pas de temps égal à $4\Delta t$ (Figure II.6). Un facteur de réponse R peut être calculé :

$$R = \frac{V_{\text{mesuré}}}{V_{\text{théorique}}} \quad (8)$$

Selon la valeur de R, trois cas de figure peuvent se présenter :

- le $V_{\text{mesuré}}$ est " proche " du $V_{\text{théorique}}$ ($R \geq R_{\text{max}}$). On peut conclure que la population microbienne est apte à supporter une augmentation de la CVA, qui est alors augmentée ;
- le $V_{\text{mesuré}}$ est inférieur à $V_{\text{théorique}}$ ($R_{\text{min}} \leq R < R_{\text{max}}$). Dans ce cas, on conclut que la population microbienne a atteint sa capacité de dégradation maximale, et la charge volumique qui était appliquée avant le pulse est maintenue jusqu'au pulse suivant ;
- le $V_{\text{mesuré}}$ est largement inférieur au $V_{\text{théorique}}$ ($R \ll R_{\text{min}}$). On conclut alors que le système est en surcharge et la CVA est diminuée.

R_{min} et R_{max} sont deux paramètres qui doivent être définis par l'opérateur. Suivant le diagnostic réalisé précédemment, le débit d'alimentation doit varier d'une valeur ΔQ . Nous proposons de relier ΔQ à la réponse du réacteur lors de la perturbation selon les relations suivantes :

$$\text{Si } R \geq R_{\text{max}} \text{ alors } \frac{\Delta Q}{Q_1} = \left(\frac{R - R_{\text{max}}}{1 - R_{\text{max}}} \right) \quad (9)$$

$$\text{Si } R_{\text{min}} \leq R < R_{\text{max}} \text{ alors } \frac{\Delta Q}{Q_1} = 0 \quad (10)$$

$$\text{Si } R < R_{\text{min}} \text{ alors } \frac{\Delta Q}{Q_1} = \left(\frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{min}}} \right) \quad (11)$$

La Figure II.6 est un exemple type de réponse positive ($R \geq R_{\text{max}}$). Le principe de cette stratégie est donc de tester "l'état" du réacteur au travers de sa réponse à une augmentation de la charge par un apport supplémentaire d'effluent pendant une heure (pulse). On augmente la CVA tant que cette capacité de dégradation progresse.

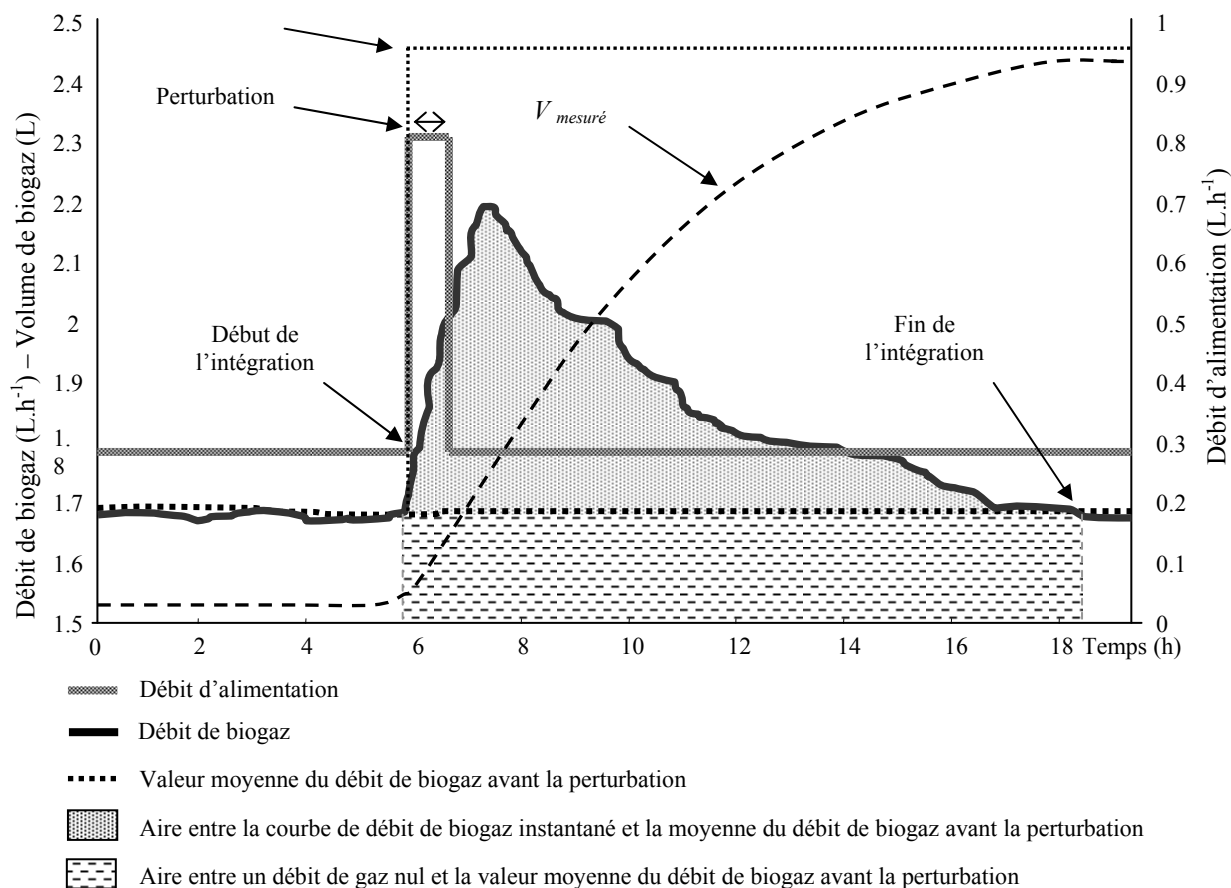


Figure II.6 : Variation type du débit de gaz en réponse à une perturbation du débit d'alimentation

II.2.3 Stratégie C : Augmentation exponentielle de la charge volumique appliquée

La durée du démarrage est fixée *a priori* à n jours. Durant ce laps de temps, la montée en charge respecte une augmentation exponentielle suivant une suite géométrique de premier terme CVA_0 (*i.e.* la charge initiale égale à $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L de réacteur}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) et de raison α . L'augmentation de la charge de déroule jusqu'à une charge finale CVA_f .

$$CVA_f = \alpha^n \times CVA_0 \quad \text{en } \text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L de réacteur}^{-1} \cdot \text{j}^{-1} \quad (12)$$

$$\text{avec } \alpha = \sqrt[n]{\frac{CVA_f}{CVA_0}} \quad (13)$$

α correspond au facteur d'augmentation journalier de la charge.

La charge volumique appliquée au jour i (CVA_i) est calculée en fonction de la charge volumique appliquée au jour $i-1$ (CVA_{i-1}) selon la formule suivante :

$$CVA_i = \alpha \times CVA_{i-1} \quad \text{en } \text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L de réacteur}^{-1} \cdot \text{j}^{-1} \quad (14)$$

L'augmentation de la CVA peut être réalisée selon deux approches différentes : soit par une augmentation de la DCO de l'alimentation avec un temps de séjour constant, soit par une diminution du TSH à DCO constante dans l'alimentation (effluent non dilué).

II.3 Suivi des réacteurs et méthodes analytiques associées

L'ensemble des mesures réalisées pour le suivi des LTI et du LF est résumé sur la Figure II.7 et la Figure II.8. Les méthodes associées à ces différentes mesures sont détaillées et classées en deux grandes parties. La première est consacrée aux mesures dites " hors lignes " ou *ex situ*, réalisées sur échantillons après prélèvement. La seconde partie est relative aux mesures réalisées par des capteurs « en ligne » susceptibles de fournir des mesures en temps réel.

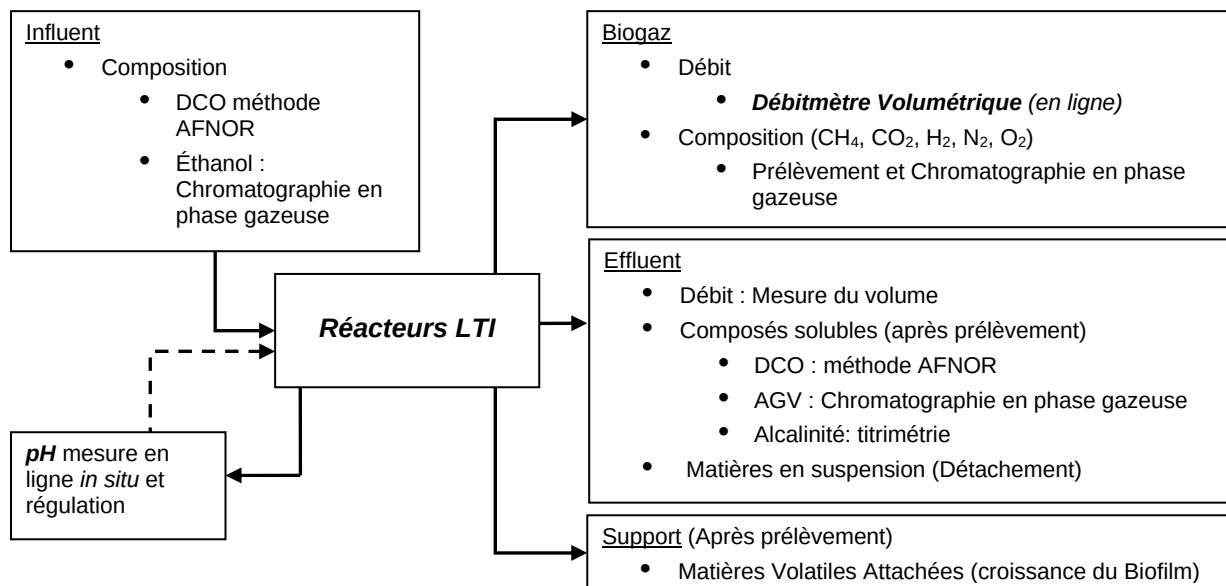


Figure II.7 : Suivi analytique des LTI et techniques associées (les mesures disponibles en ligne sont indiquées en caractères gras)

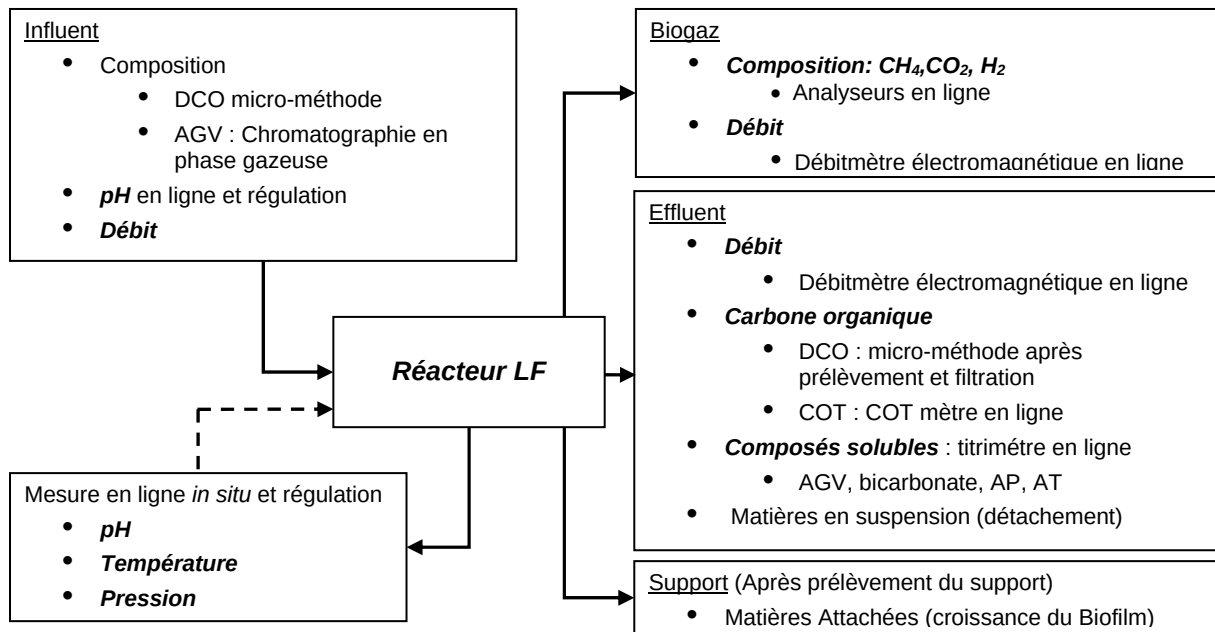


Figure II.8 : Suivi analytique du LF et techniques associées (les mesures disponibles en ligne sont indiquées en caractères gras)

II.3.1 Suivi analytique hors ligne

II.3.1.1 *Dosage des composés solubles*

II.3.1.1.1 Détermination de l'alcalinité

L'alcalinité partielle (AP) et l'alcalinité totale (AT) sont mesurées manuellement par ajout d'une solution titrée acide en présence d'un pH-mètre. Le pH d'un l'échantillon de volume V_e est relevé. Le volume V_1 correspond au volume d'acide (de l'acide chlorhydrique à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) nécessaire pour atteindre une valeur de $\text{pH} = 5,75$. On ajoute ensuite un volume supplémentaire d'acide V_2 jusqu'à atteindre une valeur $\text{pH} = 4,3$. L'AP et l'AT sont calculées à partir de ces mesures selon les formules suivantes :

$$AP = \frac{V_1 \times [HCl] \times 1000}{V_e} \quad \text{en meq.L}^{-1} \quad (15)$$

$$AP = \frac{V_2 \times [HCl] \times 1000}{V_e} \quad \text{en meq.L}^{-1} \quad (16)$$

II.3.1.1.2 Dosage de la demande chimique en oxygène

Les mesures de demande chimique en oxygène (DCO) sont réalisées sur 16000 g, 5°C , 15min), selon deux méthodes.

II.3.1.1.2.1 Macrométhode

Selon la méthode normalisée NF T 90 101 (1988), la matière organique est oxydée, en milieu acide (H_2SO_4) et en présence d'un catalyseur (Ag_2SO_4), par le bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), introduit en excès. Après deux heures de chauffage à 150°C , la DCO est déterminée par dosage en retour : l'excès de bichromate de potassium est déterminé à l'aide d'une solution de fer ferreux et d'ammonium (sel de Mohr à 0,25 N) par dosage colorimétrique, avec la ferroïne comme indicateur coloré. La mesure de la DCO est destinée à quantifier la pollution d'effluents solubles peu concentrés. La gamme de mesure est de 50 à $750 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. Pour se rapprocher le plus possible de ces conditions, les échantillons sont généralement dilués. L'erreur sur la méthode est de l'ordre de 10 à 15% et la mesure est triplée pour chaque prise d'essai.

II.3.1.1.2.2 Microméthode

Une méthode plus rapide permet de mesurer la DCO grâce à un kit de mesures commercialisé par la société Hach. Un volume de 2 ml d'échantillon est introduit dans un tube contenant les réactifs en quantité souhaitée. Après 2 heures de chauffage à 150°C , la DCO de l'échantillon est déterminée par la mesure de l'absorption à 620 nm grâce à un spectrophotomètre (Hach DR/2010).

II.3.1.1.3 Dosage de l'éthanol

L'éthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un appareil Intersmat IGC 121 DFL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne remplie : 60/80 Carbopack B / 5% Carbowax 20 M. Une solution de 2 μL composée d'un volume de la solution à doser et d'un volume d'une solution aqueuse de méthanol (étalon interne) est injectée.

II.3.1.1.4 Dosage des acides gras volatils (AGV)

La nature (acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate et isovalérate) et la concentration des acides gras volatils sont déterminées à l'aide d'un chromatographe GC800 (Fisons Instruments) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un passeur automatique d'échantillons AS800 (Fisons Instruments). La colonne utilisée est une colonne Econocap FFAP (Alltech) d'une longueur de 15 m et d'un diamètre de 0,53 cm, avec une épaisseur de film de 1,2 μm . La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 275°C . La montée en température du four est programmée de 80°C à 120°C en 3 minutes. Le gaz vecteur est un mélange d'azote (25 kPa), d'hydrogène (50 kPa) et d'air (100 kPa). Le

volume d'échantillon injecté est de 1 μL . L'analyse est effectuée sur la phase soluble (surnageant de centrifugation). Un volume d'étalon interne est ajouté à chaque volume d'échantillons (1 g d'acide éthyl-2-butyrique dans 1 L d'eau acidifiée à 5 % avec H_3PO_4). La gamme d'étalonnage est préparée à partir des six composés dosés à une concentration égale à 1 g.L^{-1} . Les échantillons sont préparés, tout comme la gamme étalon, en mélangeant un volume d'échantillon (éventuellement dilué pour être dans la gamme d'étalonnage) et un volume d'étalon interne. La gamme d'étalonnage est comprise entre 0,25 et 1 g.L^{-1} et le seuil de quantification est situé à 0,1 g.L^{-1} . L'erreur de mesure est de l'ordre de 4 à 5%.

II.3.1.2 Analyse des composés gazeux

La composition du biogaz est déterminée par chromatographie en phase gazeuse grâce à un analyseur GC-8A (commercialisé par Shimadzu) relié à un intégrateur de type C-R3A (Shimadzu). Ce chromatographe permet le dosage de six composés : CO_2 , N_2O , H_2 , O_2 , N_2 et CH_4 . La séparation est réalisée grâce à deux colonnes montées en série. La première est une colonne Hayesep Q (Touzart & Matignon) garnie de Silicagel avec une granulométrie de 80 à 100 mesh, d'une longueur de 2 m et d'un diamètre de 3,175 mm, elle permet la séparation du CO_2 et du N_2O . Dans le cas de la seconde colonne, la séparation des quatre autres gaz est réalisée grâce à un tamis moléculaire 5Å (Touzart & Matignon), d'une longueur de 2 m, d'un diamètre de 0,125 inch avec une granulométrie de 80 à 100 mesh. Les deux colonnes sont séparées par une colonne vide de 10 m de long, qui ralentit le passage des gaz au niveau du tamis moléculaire. Le gaz vecteur utilisé est l'argon (2,8 bar). La température du four est de 30°C, celle de l'injecteur et de détecteur de 100°C. Le volume d'injection est de 1 mL. La détection est réalisée à l'aide d'un catharomètre (principe du pont de Wheatstone) dont l'intensité du courant est fixée à 80 mA. La concentration des échantillons est déterminée par étalonnage externe. Le gaz étalon utilisé est composé de 25% (v/v) de CO_2 , 0,2 % de N_2O , de 5 % d' H_2 , de 2 % d' O_2 , de 10 % de N_2 et de 57,8 % de CH_4 . L'erreur de mesure est de l'ordre de 5%.

II.3.1.3 Quantification de la biomasse et suivi de la croissance du biofilm

Pour plus de fiabilité, toutes les mesures de biomasse libre ou fixée sont triplées et les résultats présentés sont une moyenne de ces trois mesures.

II.3.1.3.1 Détermination des matières sèches (MS) et des matières volatiles (MV)

La détermination des différentes fractions de la matière est réalisée par pesées et séchages des boues, selon la méthode normalisée NF T 90 105 (1972). L'écart de mesure est

de l'ordre de 3 à 5%, pour les matières totales et en suspension. Pour déterminer la teneur en matière en suspension (MES) ou en matière volatiles en suspension (MVS), un volume (V_e) d'échantillon liquide est centrifugé 15 minutes à 16000g à 5°C. Le culot de centrifugation est introduit dans un creuset en porcelaine préalablement séché, de masse connue (P_1). Cette capsule est ensuite placée dans une étuve à 105°C pendant 24 heures. L'eau est ainsi évaporée et il ne reste dans le creuset que la matière sèche. Durant ce séchage, les composés volatils comme les AGV sont volatilisés : ils ne sont pas comptés dans la mesure de la matière sèche. Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur (P_2). La différence de masses correspond donc à la matière sèche contenue dans l'échantillon : la matière en suspension peut alors être mesurée.

Le creuset est ensuite mis au four à 550°C pendant deux heures. Après refroidissement, le creuset est de nouveau pesé (P_3) : il ne reste plus que la matière minérale. La masse de la matière organique est obtenue par différence entre la masse de matière sèche et la masse de matière minérale. La matière organique est assimilée à la matière volatile à 550°C. Les matières en suspension et les matières volatiles en suspension sont donc calculées suivant les formules :

$$MES = \frac{P_2 - P_1}{V_e} \quad \text{en g.L}^{-1} \quad (17)$$

$$MVS = \frac{P_2 - P_3}{V_e} \quad \text{en g.L}^{-1} \quad (18)$$

Les matières sèches (MS) et les matières organiques (MO) sont déterminées de la même façon mais sans étape de centrifugation. Un volume de boue connu est directement introduit dans le creuset.

II.3.1.3.2 Quantification de la biomasse fixée

II.3.1.3.2.1 Sur le support mobile des LTI

Un prélèvement de support est effectué au niveau de chacun des points de piquage répartis sur la hauteur de la colonne à l'aide d'une seringue. Après rinçage à l'eau distillée, un volume de support (V_s) est mis dans un creuset préalablement taré (P_1). Le creuset est mis à l'étuve (105°C) pendant 24 heures. A sa sortie de l'étuve, le creuset est refroidi dans un dessiccateur puis pesé (P_2).

Le creuset, recouvert d'un couvercle afin d'éviter les pertes de support dues à l'éclatement, est placé dans un four à 550°C pendant deux heures, puis pesé à nouveau après

refroidissement dans un dessiccateur (P_3). Les matières volatiles attachées (MVA) sont calculées en retranchant la masse minérale restante après le passage au four, à celle des MS. Elles correspondent à la biomasse attachée. Connaissant le volume utile du réacteur et le volume apparent de support, les résultats peuvent être exprimés en $\text{g}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}_{\text{réacteur}}^{-1}$.

$$MVA = \frac{P_3 - P_2}{V_s} \quad \text{en } \text{g}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}_{\text{sup}}^{-1} \quad (19)$$

II.3.1.3.2.2 Sur le support fixe du LF

Une section de support (Cloisonyle™) nu de surface spécifique S , préalablement tarée (P_1) est introduite dans le réacteur avant l'inoculation. Après chaque phase de démarrage, cette section colonisée par le biofilm est retirée du réacteur puis séchée à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. L'eau ainsi évaporée, il ne reste sur le support que la matière sèche. Le support est alors pesé après refroidissement dans un dessiccateur (P_2). La différence de masses correspond donc à la matière sèche attachée contenue dans l'échantillon. L'étape précédente de dessiccation permet de séparer facilement le support du biofilm sec, qui est recueilli dans un creuset en porcelaine. Après avoir été pesé (P_3), le creuset est mis au four à 550°C pendant deux heures. Après refroidissement, le creuset est de nouveau pesé (P_4) : il ne reste plus que la matière minérale. Comme précédemment la masse des matières volatiles attachées (MVA), est obtenue par différence entre la masse de matière sèche attachée et la masse de matière minérale.

$$MSA = \frac{P_2 - P_1}{S} \quad \text{en } \text{g}_{\text{MSA}} \cdot \text{m}_{\text{sup}}^{-2} \quad (20)$$

$$MVA = \frac{P_4 - P_3}{S} \quad \text{en } \text{g}_{\text{MVA}} \cdot \text{m}_{\text{sup}}^{-2} \quad (21)$$

Connaissant le volume utile du réacteur et la surface spécifique totale développée par la totalité du support, les résultats peuvent être exprimés en $\text{g}_{\text{MA}} \cdot \text{L}_{\text{réacteur}}^{-1}$

II.3.1.4 Analyse granulométrique

La taille des particules (support vierge ou colonisé, agrégats cellulaires) est mesurée par granulométrie laser. Cette mesure est basée sur la diffraction et la diffusion d'un faisceau laser (théorie de Fraunhofer et de Mie). Lorsqu'une particule est éclairée par un faisceau de lumière monochromatique, il apparaît un motif de diffraction sous forme de franges concentriques alternativement claires et sombres. L'intensité du rayonnement diffracté dépend du rayon des particules. L'analyse des franges de diffraction permet de déterminer la taille des

particules. Elle est déterminée à partir d'une sphère de même volume. Les mesures sont réalisées grâce à un granulomètre LS 200 (Coulter).

Cet appareil permet de déterminer différents diamètres :

- un diamètre modal (d_p) : diamètre pour lequel la fréquence est la plus importante,
- un diamètre moyen (d_m) : diamètre de la particule dont le volume est la moyenne entre les volumes de toutes les particules de l'échantillon,
- un diamètre médian (d_{50}) : 50% des particules ont un diamètre inférieur ou égal au diamètre médian.

II.3.2 Méthodes de suivi et instrumentation en ligne

II.3.2.1 *Capteurs et suivi en ligne du LTI*

Les mesures disponibles en ligne sur les LTI sont :

- le pH du réacteur mesuré dans la boucle de recirculation,
- le débit de biogaz en sortie du réacteur.

Les signaux correspondants à ces différentes mesures sont collectés par un ordinateur via des convertisseurs numériques/analogiques par le logiciel MSPC[®] (Modular Supervision and Process Control, développé au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement). Il permet l'acquisition, le traitement et le stockage des données et fonctionne en liaison avec le logiciel Matlab[®]. Outre l'acquisition et le stockage des données, ces différents outils ont été utilisés pour commander automatiquement les pompes d'alimentation des réacteurs.

Une régulation du pH s'effectue par apport de soude (dont la concentration varie de 0,25 à 1 mol.L⁻¹ en fonction de la concentration en carbone de l'alimentation) grâce à un régulateur intégré au pH-mètre qui actionne la pompe doseuse à partir de seuils prédéfinis. Un régulateur est chargé de diminuer le débit de l'alimentation des réacteurs lorsque la valeur du pH devient inférieure à une valeur seuil. Cette valeur de consigne est fixée à pH = 6,65. Le débit d'alimentation est donc la variable d'ajustement de la charge volumique appliquée (CVA) pour les deux réacteurs, ceci afin d'éviter tout phénomène de surcharge organique.

II.3.2.2 *Capteurs et suivi en ligne du LFA*

Ce réacteur a fait l'objet de nombreuses études d'instrumentation et d'automatisation (Steyer *et al.* 2002a; Steyer *et al.* 2002b). La présence de nombreux capteurs et d'une chaîne de mesure en ligne, ainsi qu'un système d'acquisition, de traitement et d'enregistrement du

signal identique à celui utilisé lors de la première phase expérimentale sur les LTI, permet d'appréhender de façon dynamique, d'archiver et d'analyser les données relatives aux événements qui surviennent au niveau du réacteur.

Un capteur de pH effectue une mesure sur la boucle de recirculation. Les mesures de débits liquides (i.e., alimentation et recyclage) sont effectuées par des débitmètres électromagnétiques de la firme Krohne, équipés d'un système électronique de prétraitement du signal.

La mesure de débits gazeux (production de biogaz) est effectuée par un débitmètre à flotteur DK37E. Une correction du débit est nécessaire en fonction de la composition du biogaz en dioxyde de carbone et méthane. Le facteur de correction est égal à la racine carrée du rapport de la masse volumique du biogaz et de celle de l'air. La composition du biogaz en gaz carbonique et en méthane est également mesurée par un analyseur (Ultramat 22P de Siemens), le principe de la mesure reposant sur l'absorption infrarouge non-dispersive (méthode à faisceau et détecteur bicouche optopneumatique). Sur ce même circuit analytique, un analyseur AMS 6400 de la firme Perkly Hermann-Moritz couplé à un piège à H₂S effectue une mesure de l'H₂ toutes les demi-heures avec une indication directe de la concentration (en ppm). Un manomètre mesure également la pression dans le dôme du réacteur.

Un point de prélèvement permet d'injecter le milieu réactionnel dans un module d'ultrafiltration (membrane céramique avec un seuil de coupure de 0,14 µm, fabriqué par Tami Industries). Le filtrat est ensuite analysé par divers capteurs :

- le carbone organique total (COT) est mesuré en continu par un appareil Zellweger analytics de type auto TOC modèle 1950. Son principe de mesure réside en une acidification de l'échantillon à l'acide phosphorique, un ajout du gaz vecteur (air) et du persulfate de sodium avant oxydation par une lampe UV, puis une mesure du CO₂ produit par un analyseur infrarouge non dispersif. Sa plage de mesure est de 0 à 2000 ppm ;
- un capteur industriel développé par la firme Applitek sous le nom commercial d'Anasens est utilisé pour la mesure par titrimétrie des alcalinités partielle (AP) et totale (AT) et l'estimation des concentrations en acides gras volatils (AGV) et en bicarbonate à partir des courbes de titration.

II.3.3 Bilans massiques

Des bilans massiques ont été réalisés pour les expérimentations en LTI en supposant que la totalité du carbone entrant avait pour origine l'éthanol apporté par le vin. Cette hypothèse a pu être vérifiée par comparaison des valeurs théoriques de DCO de l'effluent,

calculée à partir de la concentration en éthanol mesurée, aux mesures de DCO réalisées sur ce même effluent.

Comme illustré par la Figure II.9, le flux de carbone entrant (sous forme d'éthanol) est distribué entre les voies de l'anabolisme (la production de biomasse), et les voies du catabolisme (la production de biogaz et d'AGV).

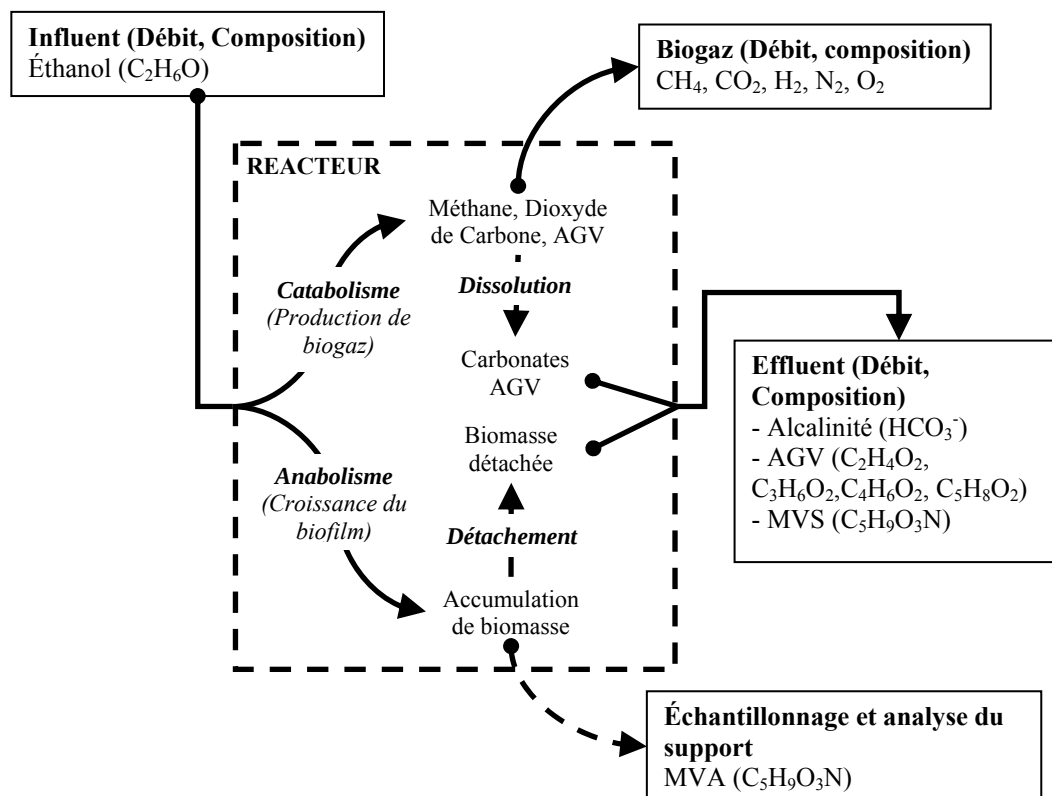


Figure II.9 : Représentation schématique des flux de carbone pris en compte pour le calcul des bilans massiques.

La quantité de biomasse (formule théorique : $C_5H_9O_3N$, (Batstone 1999)) est évaluée par la mesure des MVA et des MVS. Étant donné que le TSH est inférieur à un jour et que les taux de croissance de la grande majorité des microorganismes de la digestion anaérobie sont supérieurs à un jour (Cf. § I.1.2), la croissance de biomasse sous forme libre est considérée comme négligeable. On postule donc que la biomasse libre mesurée (après lessivage de la biomasse apportée par l'inoculum) est le fait du détachement de fragments de biofilm.

II.3.4 Définition de paramètres et calculs

II.3.4.1 Le Rendement en Méthane (Y_{CH_4}) :

Il est obtenu en rapportant le volume de méthane produit (V_{CH_4}) à la quantité de DCO dégradée (DCO_{deg}) au cours de la même période :

$$Y_{CH_4} = \frac{V_{CH_4}}{DCO_{deg}} \quad \text{en } L_{CH_4} \cdot g_{DCO_{deg}}^{-1} \quad (22)$$

II.3.4.2 L'Activité Spécifique du Biofilm (Y_{bf}) :

$$Y_{bf} = \frac{DCO_{deg}}{MVA \times V_s} \quad \text{en } g_{DCO} \cdot g_{MV}^{-1} \cdot j^{-1} \quad (23)$$

V_s étant le volume total de support.

II.4 Techniques de biologie moléculaire

II.4.1 Hybridation *in situ* en fluorescence

II.4.1.1 Fixation et conservation des échantillons

Un échantillon (2 mL) contenant des particules colonisées est prélevé à la seringue, trois volumes d'une solution de paraformaldéhyde 4% lui sont ajoutés. Après homogénéisation, le mélange est placé à 4°C pendant 3 à 5 heures. Les particules sont ensuite rincées dans la seringue avec du tampon PBS 1X avant de les reprendre dans un mélange (1:1) de PBS 1X et d'éthanol absolu. Les cellules ainsi fixées sont conservées à -20°C.

II.4.1.2 Hybridation en milieu liquide

Les particules colonisées sont rincées avec la solution d'hybridation à 20% de formamide (composition détaillée dans le Tableau II.9). L'hybridation est réalisée dans des tubes Eppendorf de 500 µL avec le mélange contenant les particules colonisées et la solution d'hybridation. Les sondes marquées sont ajoutées dans les tubes à une concentration finale de 4ng.L⁻¹. L'hybridation se fait sous agitation dans une étuve à 46°C pendant 3 heures, à l'obscurité.

Après hybridation, l'échantillon est rincé une première fois dans des tubes de 2 mL avec la solution de lavage préchauffée à 48°C (composition détaillée dans le Tableau II.10) sous

agitation douce pendant 15 minutes à 48°C à l'obscurité. Un second lavage est réalisé dans les mêmes conditions durant 30 minutes. Lorsque c'est nécessaire, une coloration au DAPI ou à la chromomycine est réalisée par ajout de ces molécules au tampon de lavage.

Tableau II.9 : Composition de la solution d'hybridation à 20% de formamide

Produit	Volume
Tampon Tris-HCl 1M pH 8	0,2 mL
NaCl 5M	1,8 mL
Formamide	2 mL
Eau ultra-pure	6 mL
SDS 10%	0,01 mL
Total	10 mL

Tableau II.10 : Composition de la solution de lavage (préchauffée à 48°C)

Produit	Volume
Tampon Tris-HCl 1M pH 8	1 mL
NaCl 5M	2,15 mL
Eau ultra-pure	46,85 mL
SDS 10%	0,01 mL
Total	50 mL

Le DAPI (diamidino-4,6-phényllindol-2 dichlorhydrate) et la chromomycine sont des fluorophores qui se fixent à l'ADN et marquent spécifiquement tous les microorganismes. Le DAPI se fixe préférentiellement aux bases A et T des chromosomes et colore plus ou moins les cellules selon leur pourcentage en bases A-T. Avant observation au microscope, 100 µL de particules support colonisées sont immobilisés sur une lame de verre dans un gel d'agarose à 1 %, puis recouverts d'une lamelle. Les caractéristiques des sondes utilisées lors de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.11 : Liste des sondes et colorants fluorescents utilisés au cours des expériences d'hybridation *in situ*

Sonde	Séquence (5' - 3')	Cibles	λ excitation	λ émission
EUB338 - CY3	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacteria	420-480	515
ARC915 - FAM	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Archaea	550	570
Colorant fluorescent				
Chromomycine		ADN	458	578
DAPI		ADN	358	461

II.4.2 Observations microscopiques

II.4.2.1 *Observations en microscopie à champ large*

Les observations ont été effectuées sur un microscope à épifluorescence Olympus BX60 équipé d'objectifs Olympus Uplan Apo 4X, 10X, 40X et 100X. La source lumineuse est constituée par une lampe à vapeur de mercure (Olympus U-ULS100HG). Un système optique, constitué d'un miroir dichroïque et de plusieurs jeux de filtres, permet d'observer successivement les signaux émis par les différents fluorochromes utilisés (*Cf.* Figure II.10). Les jeux de filtres (Olympus) utilisés (*Cf.* Tableau II.12) sont : U-MWU (observation de la coloration DAPI), U-MWB (observation de l'hybridation de sondes marquées avec les fluorochromes FAM), U-MWG (observation de l'hybridation de sondes marquées au CY3).

Tableau II.12 : Filtres utilisés en microscopie à champ large

Filtre	Miroir dichroïque	Filtre Excitation (λ nm)	Filtre d'arrêt (λ nm)
U-MWU	400	330-385	420
U-MWB	500	420-480	515
U-MWG	565	545-630	610-675

Dans le cas d'une observation en microscopie à épifluorescence, le signal fluorescent observé est donné par la totalité des signaux émis par l'objet, qu'ils soient sur le plan de la mise au point (plan focal) ou non. Cette fluorescence "en volume" donne souvent de forts bruits de fond. Une illumination concomitante de l'objet par épifluorescence et par lumière transmise (contraste de phase) permettra de superposer l'image de la fluorescence avec l'image de la structure cellulaire.

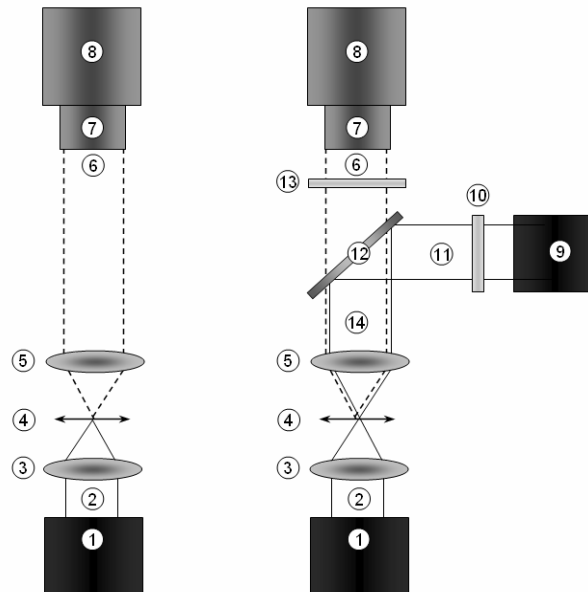


Figure II.10 : Principe de la microscopie à champ large :

(1) source de lumière blanche, (2) faisceau de lumière parallèle, (3) lentille, (4) plan de l'échantillon, (5) lentille de l'objectif, (6) faisceau de lumière transmise, (7) oculaire, (8) capteur (caméra), (9) source de lumière fluorescente, (10) filtre d'excitation, (11) faisceau d'excitation, (12) miroir dichroïque, (13) filtre d'arrêt, (14) lumière émise

Les images ont été numérisées à l'aide d'une caméra Nikon DMX 1200F (12 millions de Pixel) capable de capter des signaux de faible intensité (10^{-4} lux).

II.4.2.2 Observation en microscopie confocale laser

II.4.2.2.1 Principe

En microscopie optique classique à fluorescence, l'excitation se fait selon un double cône s'étalant de part et d'autre du plan focal objet. Par conséquent, les photons participant à la formation de l'image sont issus du plan focal mais également du volume environnant. Ainsi, pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit dans le plan focal du système optique. Lorsqu'un objet est épais ou lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image.

Afin de réduire ce flou, la solution adoptée en microscopie confocale à balayage laser - MCBL (en anglais CLSM pour confocal laser scanning microscopy) consiste à introduire un diaphragme en avant du détecteur : *le pinhole* ("trou d'aiguille"). Celui-ci n'autorise que la détection de signaux fluorescents provenant du plan focal, les photons en provenance des autres plans (en pointillés sur la Figure II.11) sont bloqués. Le plan focal objet et le plan du

diaphragme sont de ce fait des plans *focaux conjugués*, d'où le terme *confocal*. Les images obtenues ont une très faible profondeur de champ (de l'ordre de $0.6\mu\text{m}$ dans les meilleures conditions) (Brown *et al.* 2001).

A chaque observation, un faisceau laser balaye la préparation selon l'axe xy. La fluorescence ré-émise par la préparation au cours du balayage est mesurée par un photomultiplicateur en différents points du champ observé (typiquement : 512×512 points). Le signal issu du photomultiplicateur est traduit en une valeur numérique entière appelée niveau de gris et stockée dans la mémoire de l'ordinateur. On obtient ainsi directement des images numériques. Par un déplacement de la platine dans l'axe z, une série d'images peut être saisie pour obtenir un empilement de sections optiques (en xyz) et faire des reconstructions en relief. Avec plusieurs photo-multiplicateurs, différentes couleurs peuvent être imagées simultanément (Klein 2005).

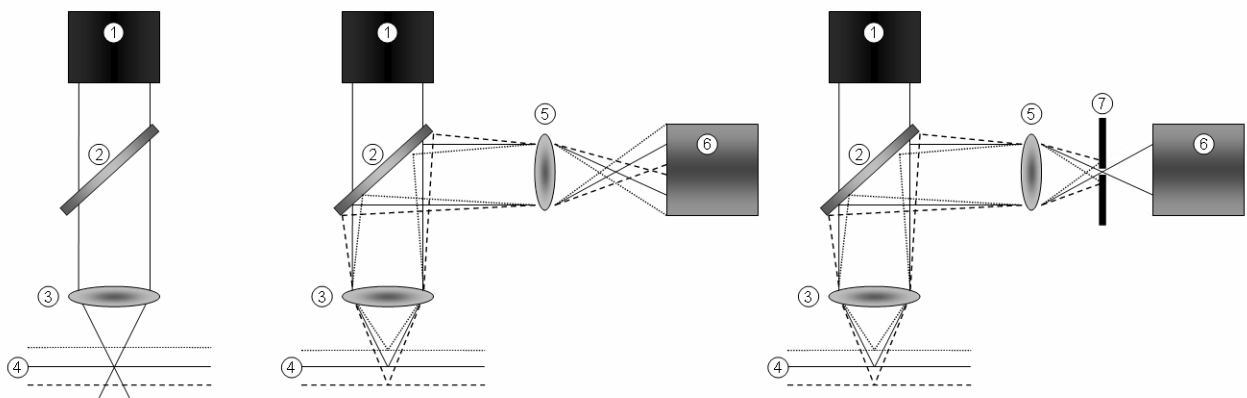


Figure II.11 : Principe de la microscopie confocale :

(1) source lumineuse laser, (2) miroir dichroïque, (3) lentille de l'objectif, (4) plan focal, (5) lentille, (6) détecteur, (7) diaphragme confocal (pinhole)

II.4.2.2.2 Matériel

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP2 équipé de trois lasers (longueurs d'onde d'excitation de 633, 543, 488 nm). L'échantillon a été hybridé simultanément avec les sondes d'intérêt, marquées par les fluorophores CY3 et FAM, ainsi qu'avec des marqueurs ADN non spécifiques (Chromomycine, DAPI). Des champs microscopiques d'une épaisseur d'observation de $1\mu\text{m}$ ont été numérisés à l'aide de l'objectif 40X et 20X en utilisant pour excitation les longueurs d'onde 488 et 543 nm.

II.4.3 Caractérisation et suivi moléculaire de la flore des digesteurs

La démarche méthodologique de caractérisation et de suivi de l'écosystème des biofilms anaérobies est illustrée par la Figure II.12.

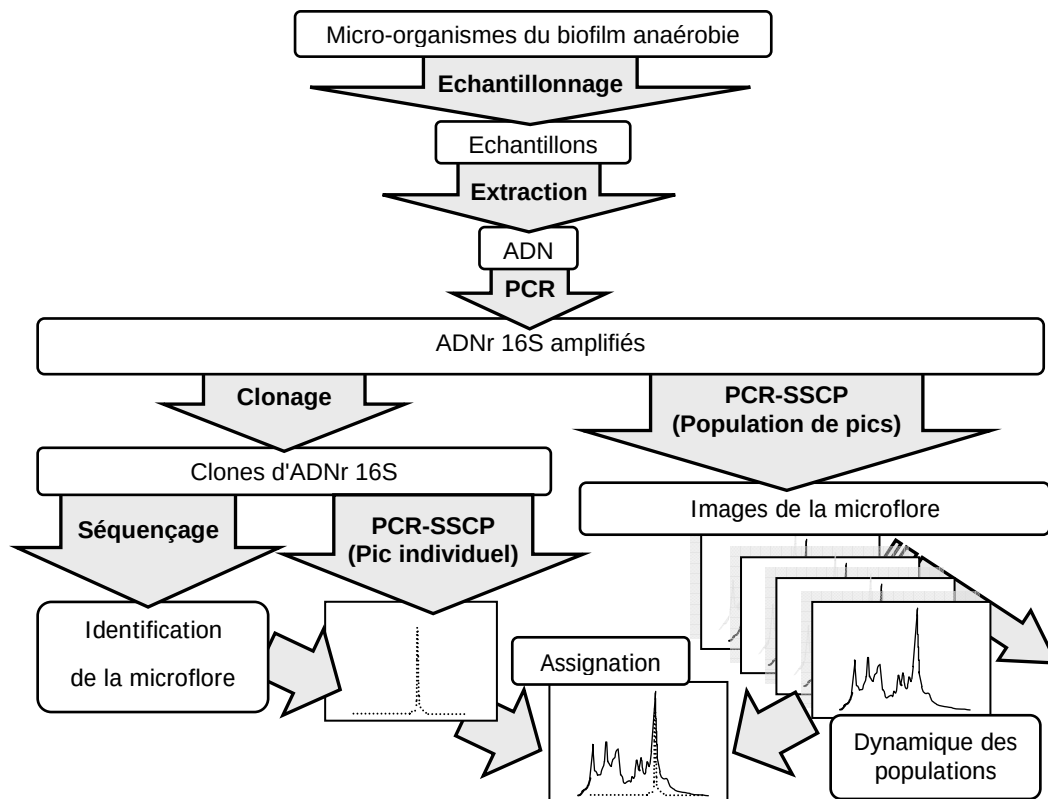


Figure II.12 : Représentation schématique de la démarche globale pour la caractérisation et le suivi des populations composant le biofilm anaérobie.

Les techniques mises en œuvre sont toutes basées sur la détection et l'analyse des gènes codant pour la petite sous-unité des ARN ribosomiques 16S, les outils moléculaires utilisés ainsi que les méthodes employées sont détaillés au cours des paragraphes suivants.

II.4.3.1 Echantillonnage et conservation des échantillons

Un prélèvement de 5 ml (3ml de la phase liquide + 2ml support colonisé) est réalisé sur le réacteur à l'aide d'une seringue de 10 ml.

II.4.3.1.1 Echantillonnage de la biomasse durant la phase d'inoculation

Le contenu de la seringue est filtré sur une grille métallique recouverte d'un filtre de nylon (47mm de diamètre, pore 10µm, préalablement stérilisé 30 minutes aux UV) à l'aide d'un dispositif de filtration sous vide. L'inoculum est recueilli dans un tube de centrifugation stérile de 50 ml placé dans le dispositif de filtration sous vide. Le support retenu sur la grille

est ensuite rincé plusieurs fois avec du PBS 1X (10 ml) et les solutions de rinçage sont collectées dans des tubes de centrifugation. Chaque solution de rinçage est ensuite filtrée à l'aide du dispositif de filtration en verre stérilisé à la flamme et de filtres polyéthersulfones blancs (pore 0,2µm ; diamètre 47mm). Les filtres sont finalement congelés à -80°C dans un tube de 2 ml à vis, puis broyés à l'aide d'un pilon préalablement stérilisé, jusqu'à obtenir une poudre fine homogène. Après ajout de 375µl de guanidine thiocyanate 4M-Tris-Cl pH 7.5 0.1M, les tubes sont conservés à -20°C.

II.4.3.1.2 Echantillonnage de la biomasse adhérent au support

Après rinçage, les billes sont écrasées à l'aide d'un mortier pour obtenir une solution homogène. Après broyage, l'échantillon est repris dans 1 mL de guanidine thiocyanate 4M Tris-Cl pH=7,5 et 500 µL de N-Lauroyl-sarcosine 10%. Des aliquots de 500 µL sont conservés à -20°C.

II.4.3.2 Extraction et purification de l'ADN total des échantillons

Le protocole détaillé de l'extraction et purification de l'ADN total est précisé dans Godon et al. (1997). La lyse cellulaire se fait par chauffage (à 70°C pendant 1h) puis par action mécanique des micro-billes de zirconium dans un vibro-broyeur pendant dix minutes. Les inhibiteurs de PCR (acides humiques) sont éliminés par lavages successifs au PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). L'ADN est précipité à l'isopropanol. Lors de cette étape l'ajout de 5 µL d'ADN carrier (polyA) est effectué afin d'améliorer la précipitation. L'ADN est ensuite récupéré par centrifugation (15 minutes, 15000 rpm). La purification est exécutée sur micro-colonne du Kit QIAamp Mini (Qiagen) permettant l'obtention de 30µL de matrice. L'ADN ainsi extrait est conservé à -20°C. Un témoin d'extraction d'ADN est réalisé à partir d'un filtre stérile subissant toutes les étapes d'extraction et d'amplification. Ce témoin " extraction " est ensuite comparé aux échantillons par analyse SSCP. Ce contrôle permet de vérifier si les produits d'extraction ne sont pas contaminés.

L'extraction de l'ADN des échantillons a également été réalisée avec le kit QIAAMP DNA STOOL fournissant tous les produits utilisés pour cette manipulation. Elle se résume en trois étapes : une lyse des cellules dans un bain à 95°C, l'élimination des inhibiteurs, et enfin la purification de l'ADN sur une colonne d'affinité.

Une estimation de la quantité et de la qualité de l'ADN obtenu est effectuée par électrophorèse : l'ADN migre à travers un gel d'agarose à 0,7% dans un tampon de migration Tris Borate EDTA (TBE 1X) en présence de bromure d'éthidium (BET) et il est visualisé en

lumière U.V. La taille et la concentration des fragments d'ADN obtenus sont évaluées par comparaison avec le marqueur de taille λ Hind III (Proméga), recouvrant un intervalle de 125 à 23130 paires de bases.

II.4.3.3 Amplification de la région V3 de l'ADNr 16S

Le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) est utilisé pour amplifier spécifiquement un fragment d'ADN (200pb) correspondant à la région variable V3 du gène de l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). Les amorces universelles bactériennes utilisées W49 et W104, dont les séquences sont spécifiées dans le Tableau 4, sont situées dans des régions conservées encadrant la région V3. Une des amorces est marquée par une molécule fluorescente à son extrémité 5'. L'enzyme utilisée pour la réaction de PCR est la polymérase thermostable Pfu Turbo® DNA Polymerase (Stratagene). Les conditions opératoires sont décrites par le Tableau II.13 et le Tableau II.14.

Tableau II.13 : Séquence des amorces utilisées en PCR

Amorce	Séquences (5' - 3')	Position	Cible	Auteur
<i>Amplification de l'ADNr 16S total</i>				
W02	GNTACCTTGTTACGACTT	R1492	ADNr16S Universel	(Godon <i>et al.</i> 1997a)
W18	GAGTTTGATCNTGGCCAG	F9	ADNr16S Bactérien	(Godon <i>et al.</i> 1998b)
W17	ATTCYGGTTGATCCYGSCR	F3	ADNr16S Archæa	(Godon <i>et al.</i> 1998b)
W31	TACCGCGGCTGCTGGCAC	R533	ADNr16S Universel	(Godon <i>et al.</i> 1998b)
<i>PCR-SSCP</i>				
W49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	F329 – 348	ADNr16S Bactérien	(Zumstein <i>et al.</i> 2000)
W104	*6FAM- TTACCGCGGCTGCTGGCAC	R515 – 533	ADNr16S Universel	(Zumstein <i>et al.</i> 2000)
W116	*HEX-TCCAGGCCCTACGGGG	F330	ADNr16S Archæa	(Zumstein <i>et al.</i> 2000)
<i>PCR sur colonie</i>				
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-	ADN plasmidique	(Godon <i>et al.</i> 1997a)
P13	GACCATGATTACGCCAA	-	ADN plasmidique	(Godon <i>et al.</i> 1998b)

La position des amorces est indiquée d'après *E.coli* ; N=A/T/G/C ; Y=T/C ; * amorces marquées en avec un fluorophore ; F : Sens (Forward), R : Antisens (Reverse)

Lorsque l'amplification directe de la région V3 donne un signal trop faible en particulier lors de l'amplification des ADNr 16S des populations d'*Archæa*, deux PCR successives (PCR nichée) ont été réalisées à partir du même ADN total afin d'abaisser le seuil de détection. Lors d'une première PCR, le couple d'amorces W02-W17 permet d'amplifier

l'intégralité de l'ADNr 16S des *Archaea*. Un microlitre du produit de cette première PCR est utilisé comme matrice pour une seconde PCR effectuée à l'aide des amorces W104-W116. L'amplification est vérifiée sur un gel d'agarose à 2% et la taille des fragments est visualisée grâce à un marqueur de taille (Proméga) recouvrant l'intervalle de 100 à 2642 paires de bases. Les produits de PCR sont purifiés sur des colonnes Quiaquick (Qiagen) afin d'éliminer les amorces non incorporées.

Tableau II.14 : Mélanges réactionnels utilisés pour les PCRs

Produit	PCR	PCR-SSCP	PCR sur colonie
Enzyme polymérase	<i>LD TAQ</i> [®] 0.25 µL soit 2,5U	<i>Pfu turbo</i> [®] 0.5 µL soit 2.5U	<i>RedTAQ</i> [®] 0.5 µL soit 1.25U
Tampon	5 µL à 10X	5 µL à 10X	2 µL à 10X
dNTP	4 µL à 2,5 mM	4 µL à 2,5 mM	1.6 µL à 2,5 mM
Amorce Sens	2 µL à 100 ng.µL ⁻¹	-	-
Amorce Antisens	2 µL à 100 ng.µL ⁻¹	-	-
Amorce SSCP	-	1,3µL à 100 ng.µL ⁻¹	0.8µL à 100 ng.µL ⁻¹
Amorce SSCP	-	1,3µL à 100 ng.µL ⁻¹	0.8µL à 100 ng.µL ⁻¹
Matrice	1 µL	1 µL	1 µL
Eau stérile	Qsp 50 µL	Qsp 50 µL	Qsp 20 µL

Tableau II.15 : Paramètres de l'amplification par PCR

PCR avec <i>LD TAQ</i> [®]			PCR-SSCP avec <i>Pfu turbo</i> [®]		PCR sur colonie avec <i>redTAQ</i> [®]	
Etapas	Température	Durée	Température	Durée	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	10min	94°C	10 min	94°C	2 min
Dénaturation	95°C	30s	94°C	1 min	94°C	1 min
Hybridation	Dépend de l'amorce utilisée	30s	Dépend de l'amorce utilisée	1 min	50°C	1 min
Elongation	72°C	1min	72°C	1 min	72°C	1 min
Nombre de cycles		25		25		25
Elongation finale	72°C	10min	72°C	10 min	72 °C	10 min

II.4.3.4 Analyse SSCP

Avant analyse, les produits de PCR (1 %L) sont mélangés à 18,8 µL de formamide (Applera[®]) et à 0,2 µL d'étalon interne (GS 400 HD-rox, Applera[®]). Ils sont ensuite dénaturés par chauffage (5 min à 95°C) puis refroidis rapidement (10 min dans l'eau glacée).

Après cette renaturation rapide, les fragments d'ADNr 16S simple brin adoptent une conformation secondaire stable qui permettra de les séparer par électrophorèse capillaire. L'électrophorèse se fait en TBE 1X (Applied Biosystems)-GeneScan Polymère 5,6% (Applied Biosystems)-Glycérol 10% dans un séquenceur automatique Abi primis 310 Applied Biosystems équipé d'un capillaire de 47 cm. Les conditions de migration sont: tampon TBE 1X-10% glycérol, 12 kV, 32°C et 30 min.

La détection des produits de PCR se fait grâce au marquage fluorescent de l'amorce W104. L'analyse des résultats se fait avec le logiciel GeneScan 3.1. On obtient un profil électrophorétique où chaque pic correspond théoriquement à une espèce moléculaire. L'aire mesurée sous les pics d'un profil SSCP est proportionnelle au niveau d'amplification de l'ADN des micro-organismes correspondants et reflète en première approximation l'abondance relative de l'espèce correspondante au sein de la communauté microbienne dont sont extraits les ADN. Ainsi, l'évaluation de l'aire sous chaque pic par rapport à la surface totale du profil permet d'estimer la proportion de la population microbienne correspondante (pic) au sein de la communauté (profil). Un logiciel développé au laboratoire permet d'estimer ces surfaces. Cette mesure normalisée est exprimée sous la forme d'un disque dont le diamètre est proportionnel à l'aire mesurée sous le pic par rapport à l'aire totale sous le profil. Ce type de représentation permet une lecture facilitée par un éventuel réarrangement de l'ordre des pics et la standardisation de la distance les séparant.

II.4.3.5 Clonage des séquences d'intérêt

Afin d'assigner une espèce bactérienne à chaque pic majoritaire du profil SSCP, la région variable V3 de l'ADNr 16S des échantillons est amplifiée par PCR avec les amorces W31 et W49 (voir §II.4.3.3 pour le protocole et les paramètres de l'amplification par PCR). Les produits de PCR obtenus sont vérifiés par migration sur gel d'agarose 2% avant d'être purifiés sur une micro-colonne Quiagen afin d'éliminer les amorces en excès. Ils sont enfin clonés dans un plasmide d'*E. coli* comportant un gène tueur (ccdB) et un gène de sélection (résistance à la kanamycine). L'insertion d'un fragment d'ADN dans le site de clonage du plasmide interrompt le gène ccdB et permet la survie du recombinant.

Les cellules compétentes TOP10 *E. coli* sont ensuite transformées en suivant le protocole du kit TopoTA cloning kit (Invitrogen®). Les clones sont purifiés par stries sur milieu solide LB (Luria Broth Agar) + Kanamycine (25 mg.mL⁻¹). Une PCR nichée avec les amorces T7-P13 et la polymérase redTaq®, puis avec les amorces W49-W104 et la polymérase Pfu turbo®, est effectuée pour chaque clone. Les détails de la préparation des

échantillons et des paramètres de la PCR sont donnés dans les Tableau II.13 et Tableau II.14. Les produits de la PCR nichée sont ensuite analysés par SSCP et comparés au profil total. Cette étape d'analyse des clones par SSCP permet une assignation des clones avec les pics visualisés sur le profil complexe. Seuls les clones générant un pic qui co-migre avec les pics du profil complexe seront séquencés.

II.4.3.6 Identification des clones

L'identification des inserts est effectuée par séquençage après repiquage sur microplaque (96 puits) dans un milieu YT (Yeast Trypton) + kanamycine et à 5% de glycérol. La microplaque est envoyée à la société MILLEGEN (Prologue Biotech, Labège - FRANCE) qui nous communique ensuite les séquences. Les séquences partielles d'environ 200 pb obtenues sont alors comparées entre elles et avec les séquences présentes dans les bases de données internationales (Genbank) grâce au logiciel BLAST Nucleotide du National Center for Biotechnologies Informations (<http://www.ncbi.nih.gov>).

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1 Etude des premières phases de la colonisation bactérienne du support lors de l'inoculation des digesteurs anaérobies à biomasse fixée	131
III.1.1 Mise en évidence de la colonisation précoce du support.....	132
III.1.2 Maturation du biofilm et développement différentiel de certaines espèces bactériennes sur le support.....	135
III.1.3 Conclusions	137
III.2 Impact des conditions hydrodynamiques sur le démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse.....	139
III.2.1 Conditions de démarrage	139
III.2.2 Impact des conditions hydrodynamiques sur la phase de montée en charge	140
III.2.3 Egalisation des contraintes hydrodynamiques	149
III.2.4 Conclusions	151
III.3 Comparaison des stratégies de l'épuration maximale (A) et de la charge maximale (B) et influence de la composition du milieu en éléments traces lors du démarrage de réacteurs à lit turbulent inverse	153
III.3.1 Phase I : acclimatation	155
III.3.2 Phase II : montée en charge et croissance du biofilm en conditions limitantes	160
III.3.3 Phase III : ralentissement de la croissance et carence en micronutriments	164
III.3.4 Phase IV : complémentation en éléments traces métalliques, montée en charge et croissance du biofilm en conditions non limitantes	168
III.3.5 Conclusions	169
III.4 Etude moléculaire des écosystèmes lors de la phase de démarrage des LTI selon les stratégies A et B.	173
III.4.1 Dynamique des populations.....	173
III.4.2 Dégradation de l'éthanol.....	180
III.4.3 Organisation spatiale du biofilm.....	185
III.4.4 Conclusions	188
III.5 Etude comparative des stratégies de montées en charge exponentielles par augmentation de la concentration (C_1) ou du débit d'alimentation(C_2) lors du démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse	189
III.5.1 Conditions opératoires	189
III.5.2 Montée en charge et performances épuratoires	190
III.5.3 Croissance du biofilm : compétition entre biomasse libre et biomasse fixée	197
III.5.4 Activité	203
III.5.5 Conclusions	207
III.6 Optimisation du démarrage d'un réacteur à lit fixe ascendant	208
III.6.1 Conditions opératoires	208
III.6.2 Comparaison des stratégies A (épuration maximale) et C (montée en charge exponentielle).	210
III.6.3 Performances des réacteurs lors de la montée en charge exponentielle	214
III.6.4 Développement du biofilm	218
III.6.5 Conclusions	221

Une première phase de l'étude, présentée au chapitre 0, a été menée sur l'étape d'inoculation des réacteurs à Lit Turbulé Inverse (LTI) de laboratoire afin d'apporter des connaissances supplémentaires sur le contact initial entre les cellules et la surface du support solide. Lors d'une seconde phase, le suivi simultané de deux LTI a permis d'analyser l'influence de plusieurs paramètres sur la mise en place et la maturation d'un biofilm anaérobie lors de la montée en charge des digesteurs, permettant ainsi d'optimiser leur démarrage.

Enfin, au cours d'une troisième phase expérimentale, les résultats obtenus pour les LTI ont été transposés et validés sur un réacteur à lit fixe (LF) de plus grande capacité (1m^3) alimenté par un effluent réel (vinasses de distillerie). Le Tableau III.1 résume les paramètres étudiés pour chacune des montées en charge réalisées lors du démarrage des différents réacteurs, soit : la durée de la phase d'inoculation, les contraintes hydrodynamiques (imposées par la vitesse de recirculation du biogaz), le paramètre de contrôle de la montée en charge et le temps de séjour hydraulique.

Tableau III.1 Conditions opératoires appliquées pour la montée en charge des réacteurs

Conditions opératoires							
Chapitre	Procédé	Stratégie	Montée en charge	TSH	DCO de l'effluent	Vitesse du gaz	Phase d'inoculation
III 2	LTI	A	Fonction du rendement épuratoire	1 jour	0,5 à 8 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	1mm.s ⁻¹	12 heures
	LTI	A	Fonction du rendement épuratoire	1 jour	0,5 à 6 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	10mm.s ⁻¹	12 heures
III 3	LTI	A	Fonction du rendement épuratoire	1 jour	0,5 à 20 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	1mm.s ⁻¹	12 heures
	LTI	B	Fonction du débit de biogaz	1 jour	0,5 à 20 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	1mm.s ⁻¹	12 heures
III 5	LTI	C ₁	Exponentielle (30 jours)	1 jour	0,5 à 20 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	1mm.s ⁻¹	Minimale (durée du remplissage)
	LTI	C ₂	Exponentielle (30 jours)	de 40 à 1 jours	20 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	1mm.s ⁻¹	Minimale (durée du remplissage)
III 6	LF	A	Fonction du rendement épuratoire	1 jour	1 à 18 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	-	72 heures
	LF	C ₁₁	Exponentielle (25 jours)	1 jour	0,5 à 20 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	-	Minimale (durée du remplissage)
	LF	C ₁₂	Exponentielle (20 jours)	1 jour	0,5 à 20 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}$	-	24 heures

III.1 Etude des premières phases de la colonisation bactérienne du support lors de l'inoculation des digesteurs anaérobies à biomasse fixée

Lors du démarrage d'un réacteur biologique à biomasse fixée, la phase d'inoculation correspond à une période de fonctionnement du réacteur en mode " fermé ", afin de favoriser le contact entre le support et les microorganismes libres apportés par l'inoculum. Cette période est destinée à promouvoir la formation d'une première couche de cellules sur le support et ainsi initier la formation du biofilm. La durée de la phase d'inoculation, dont il est rarement fait mention dans la littérature, est fixée le plus souvent de manière empirique. Elle varie de quelques jours à plus d'un mois selon les auteurs (Marin *et al.* 1999; Celis-García *et al.* 2005; Ye *et al.* 2005). A ce jour, peu d'études ont porté sur la compréhension et l'optimisation de cette étape cruciale qui, pourtant, va conditionner la vitesse de montée en charge et les performances des bioréacteurs durant les premières phases du démarrage. L'objectif de cette étude était de " visualiser " la communauté bactérienne fixée sur le support au cours de la phase d'inoculation d'un réacteur à lit turbulent inverse, afin d'optimiser sa durée. L'utilisation de la PCR-SSCP permet, grâce à un seuil de détection très bas, de détecter et de caractériser les populations bactériennes adhérant de façon précoce lors des phases initiales de la formation du biofilm.

Selon les protocoles définis au chapitre matériel et méthodes, des prélèvements ont été réalisés 12 heures et 12 jours après l'inoculation. Les particules prélevées ont subi une série de rinçages successifs et chaque solution de rinçage a été analysée (filtration, extraction d'ADN total, amplification de la région variable V3 des gènes des ARN ribosomiques par PCR, électrophorèse SSCP des produits de PCR).

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de profils électrophorétiques. Ces profils correspondent à une empreinte moléculaire de l'échantillon analysé. Chaque pic témoigne de la présence d'au moins une espèce bactérienne et l'aire sous les pics représente l'abondance relative de (s) l'espèce (s) bactérienne (s) correspondante (s). L'alignement des profils permet la comparaison des populations bactériennes présentes :

- sur les particules de support après rinçage,
- dans les solutions de rinçage,
- dans la phase liquide du réacteur.

III.1.1 Mise en évidence de la colonisation précoce du support

Analyse des prélèvements réalisés douze heures après l'inoculation :

Les particules de support (2 ml) prélevées douze heures après l'inoculation ont subi une série de dix rinçages successifs, sans agitation, réalisés avec 10ml d'une solution de PBS 1X. Les empreintes moléculaires de l'écosystème présent sur le support après ces 10 rinçages ainsi que celles de l'inoculum sont présentées sur la Figure III.1. Les empreintes des deux écosystèmes sont superposables, suggérant que la majorité des espèces bactériennes présentes dans l'inoculum ait adhéré au support douze heures seulement après le contact initial. Ces résultats confirment la théorie d'une fixation précoce, conformément aux modèles proposés dans la littérature (Ghigo 2003) (Stoodley *et al.* 2002).

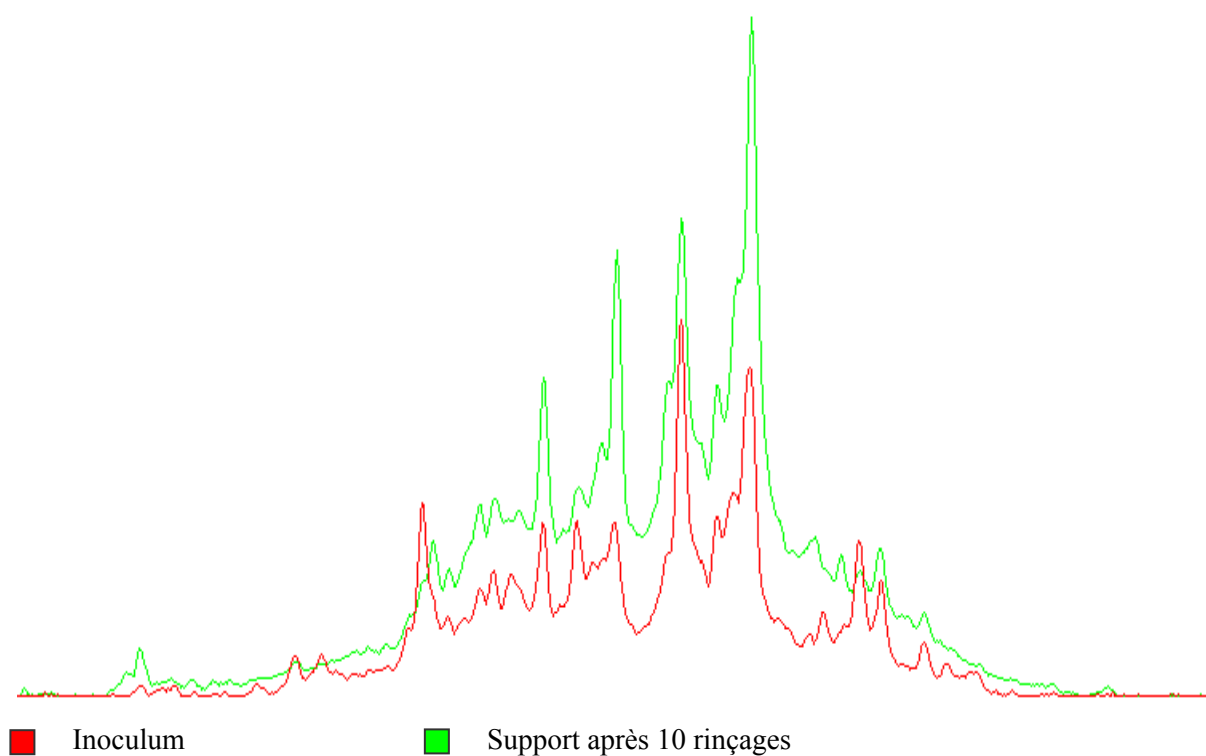


Figure III.1 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S bactériens obtenus à partir de l'inoculum et de support prélevé douze heures après l'inoculation.

Selon ces modèles, durant la phase initiale d'inoculation, les macro-molécules organiques présentes dans la phase liquide vont s'adsorber très rapidement sur la surface du support et créer un film conditionnant qui va faciliter la fixation des microorganismes et le développement d'un biofilm actif. En parallèle, grâce aux mécanismes de convection générés

par les conditions de mélange, les cellules libres vont être transportées à la surface du support. Des interactions vont s'établir, entraînant l'adhésion réversible des cellules à la surface du support. Ces phénomènes d'adhésion sont généralement de nature physico-chimique et non spécifiques. Les forces mises en jeu varient en fonction de la nature du support et des microorganismes. Cette fixation précoce des microorganismes à la surface du support témoigne donc principalement de phénomènes passifs d'adhésion quasi instantanés. Les conditions optimales de mélange régnant dans les LTI et les propriétés du support (porosité, rugosité) favorisent vraisemblablement le transport et l'adsorption des microorganismes aux surfaces.

Chacune des solutions ayant servi au rinçage du support a été analysée, la Figure III.2 présente les profils SSCP obtenus pour les solutions du 3^{ème} du 6^{ème} et du 10^{ème} rinçage.

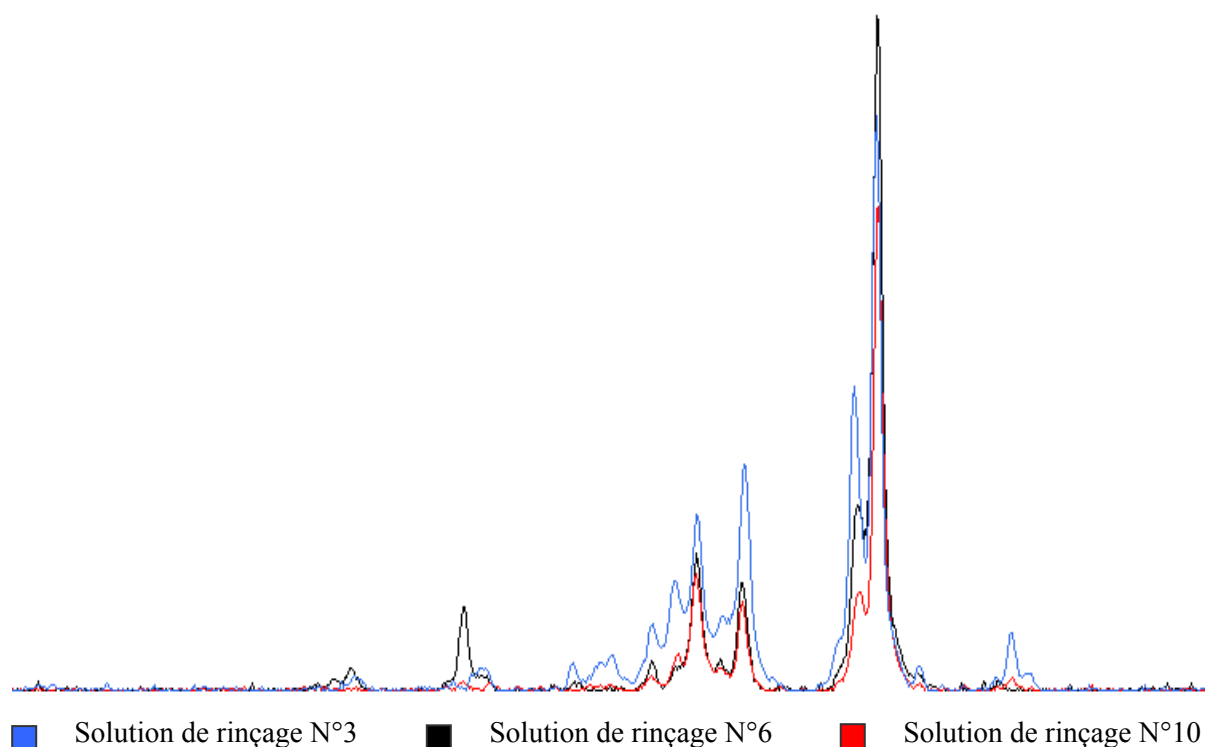


Figure III.2 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S présents dans les solutions de rinçage du support prélevé douze heures après l'inoculation

Les profils SSCP de ces différentes solutions de rinçage sont superposables. Chaque rinçage successif entraîne donc le décrochement des mêmes espèces bactériennes ayant adhéré faiblement au support. La comparaison de ces profils à celui de l'écosystème présent sur le support (Figure III.3) montre une différence importante. Ainsi, si toutes les populations

bactériennes présentes dans l'inoculum ont adhéré au support, seules certaines espèces semblent être décrochées par un rinçage doux.

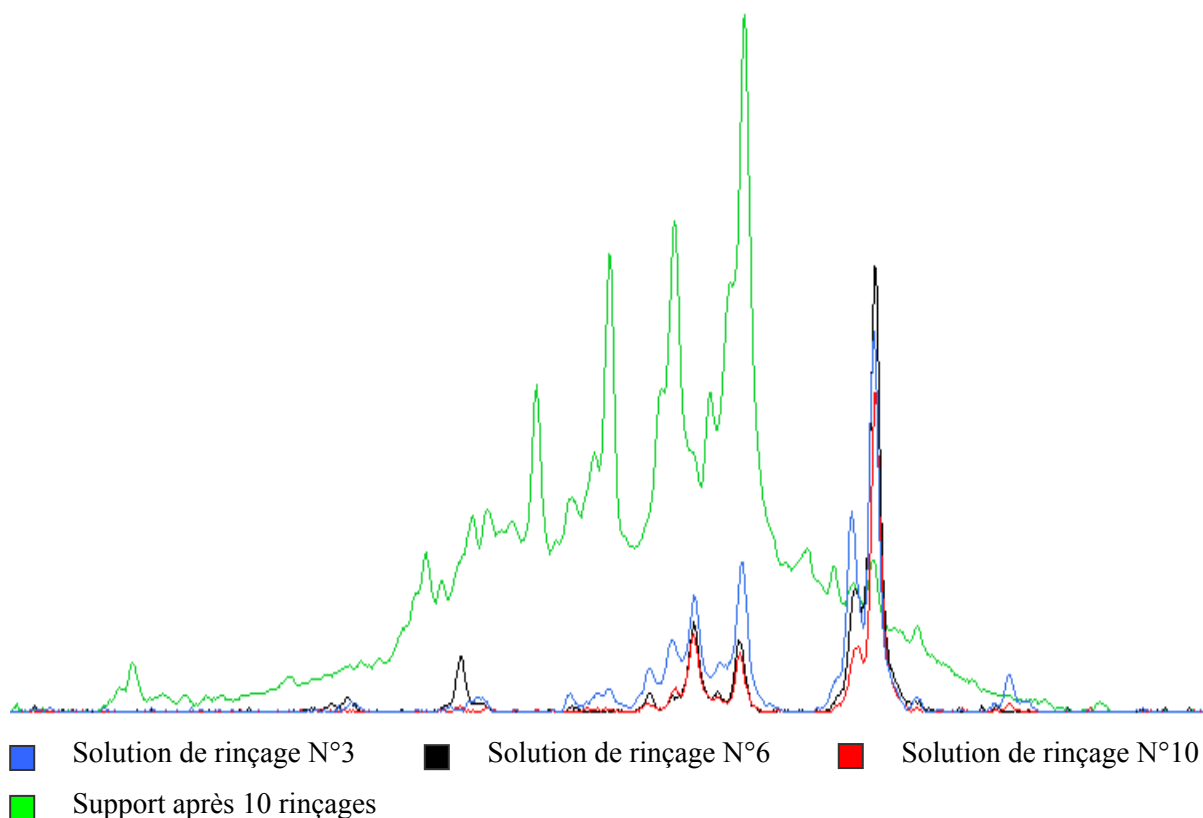


Figure III.3 : Alignement du profil SSCP réalisé à partir du support prélevé douze heures après l'inoculation et ayant subi dix rinçages avec ceux réalisés à partir des solutions du 3^{ème}, du 6^{ème}, et du 10^{ème} rinçage.

Ce détachement préférentiel peut être expliqué par une aptitude moins grande de ces bactéries à rester fixées à la surface du support. Les contraintes physiques (cisaillement) exercées lors des rinçages du support entraînent leur détachement et leur lessivage, alors que les autres espèces bactériennes, adhérant plus fortement, restent fixées. A ce stade du développement du biofilm, l'aptitude de certaines espèces à rester fixées peut être expliquée principalement par des mécanismes *passifs*, dus à une meilleure compatibilité entre la surface bactérienne et la surface du support, qui permet la mise en place d'interactions de faible énergie soit chimiques (forces de Van der Waals, liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, interactions acido-basiques), soit électrostatiques. Dans une moindre mesure, des mécanismes *actifs*, comme la mobilisation d'appendices membranaires de type pili ou flagelles, pourraient également être impliqués.

III.1.2 Maturation du biofilm et développement différentiel de certaines espèces bactériennes sur le support

Analyse des prélèvements réalisés douze jours après l'inoculation :

Après douze jours de fonctionnement en mode " fermé ", des prélèvements de support et de la phase liquide du réacteur ont été réalisés. Les particules prélevées ont été lavées et analysées selon le même protocole que celui présenté précédemment. Les solutions de rinçage du support (dix volumes de 10ml chacun) ainsi que le prélèvement de la phase liquide du réacteur ont également été analysés.

Le profil SSCP obtenu à partir de la phase liquide diffère de celui des échantillons de support après rinçage (). Même si plusieurs espèces de la phase liquide semblent être également présentes sous forme fixée, on note sur le profil du support lavé l'absence de plusieurs pics très importants situés sur la droite du profil obtenu pour la phase liquide. Ainsi, parmi toutes les espèces présentes dans la phase liquide, seules certaines ont adhéré et croissent sous la forme d'un biofilm.

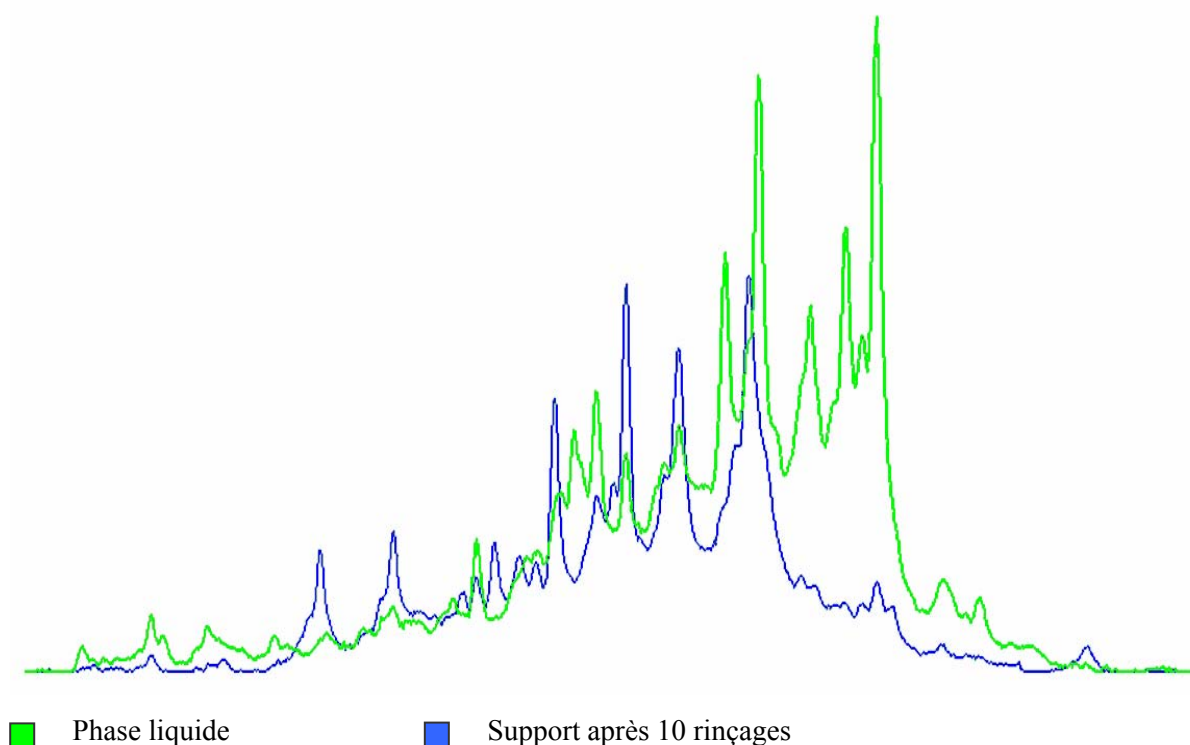


Figure III.4 : Alignement du profil SSCP réalisé à partir du support prélevé 12 jours après l'ensemencement et ayant subi 10 rinçages avec celui de la phase liquide du réacteur.

Les profils de pics obtenus à partir des solutions de rinçage sont globalement superposables (Figure III.5). Ces échantillons ayant subi le même protocole d'analyse, une comparaison semi-quantitative entre les différents profils peut être établie. Ainsi, la quantité

d'ADNr 16S présente dans les solutions de rinçage semble décroître avec le nombre de rinçages. Le signal obtenu dans la dixième solution de rinçage est très faible et semble indiquer que la majorité des bactéries susceptibles d'être décrochées dans les conditions du rinçage ont été entraînées. De plus, les profils des solutions de rinçage sont comparables à celui du support ayant subi dix rinçages. Douze jours après l'inoculation, les bactéries détachées lors des rinçages sont donc représentatives de l'ensemble des bactéries qui composent le biofilm. A ce stade de développement, la maturation du biofilm est plus avancée. Les phénomènes responsables de l'adhésion irréversible telles que la co-adhésion ou la production exopolymères ont eu lieu. Les cellules, fortement liées entre elles par la matrice, forment un ensemble pluricellulaire cohérent adhérent au support. Ainsi, chaque cellule composant le biofilm étant enchâssée dans la matrice et soumise aux mêmes forces de cohésion, contrairement aux rinçages effectués douze heures après l'inoculation, un détachement préférentiel n'est pas observé.

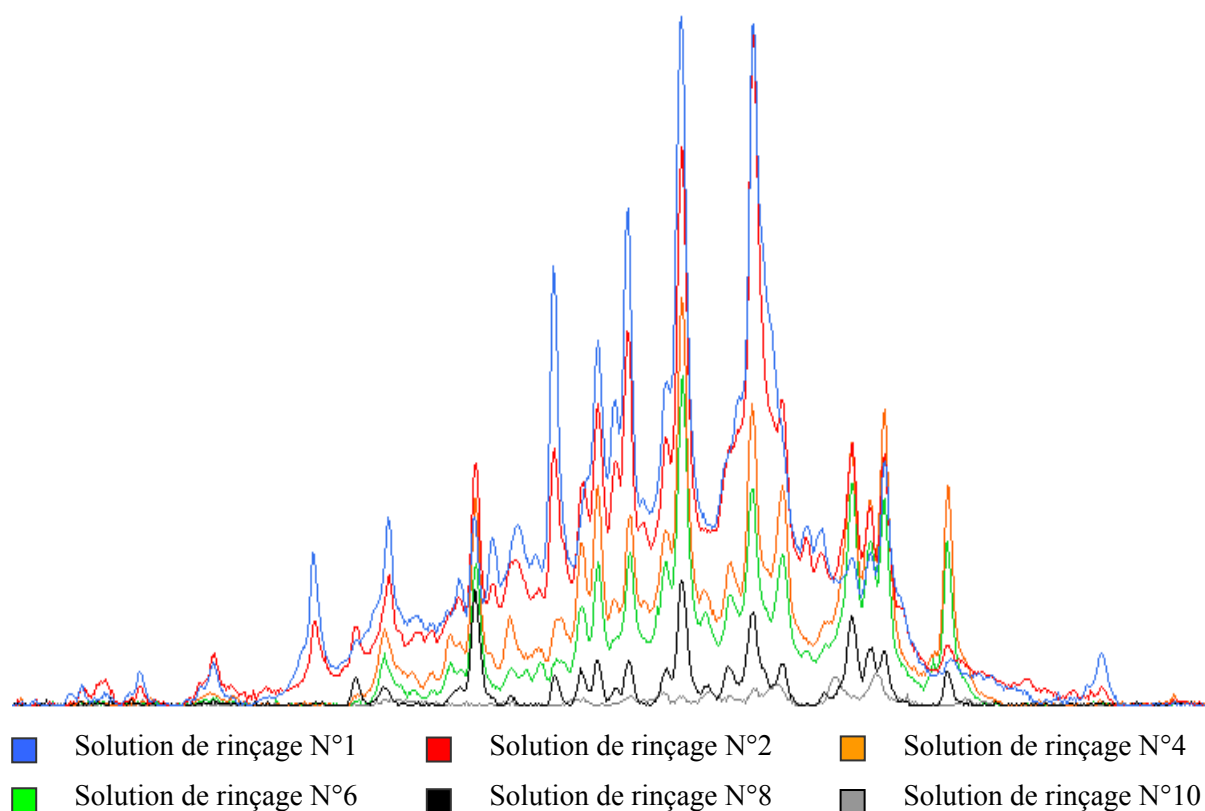


Figure III.5 : Alignement des profils SSCP des solutions de rinçage du support prélevé douze jours après l'inoculation.

En fait, les pics absents du profil obtenu à partir des échantillons de support prélevés douze jours après l'inoculation co-migrent avec les pics correspondant aux espèces les plus facilement détachées lors du rinçage des particules réalisé douze heures après l'inoculation

(Figure III.6). Il semble donc que les bactéries identifiées comme étant les plus facilement détachées après l'étape d'adhésion initiale de douze heures ne se soient pas développées dans le biofilm. Ces résultats suggèrent une aptitude différente de certaines bactéries à former un biofilm.

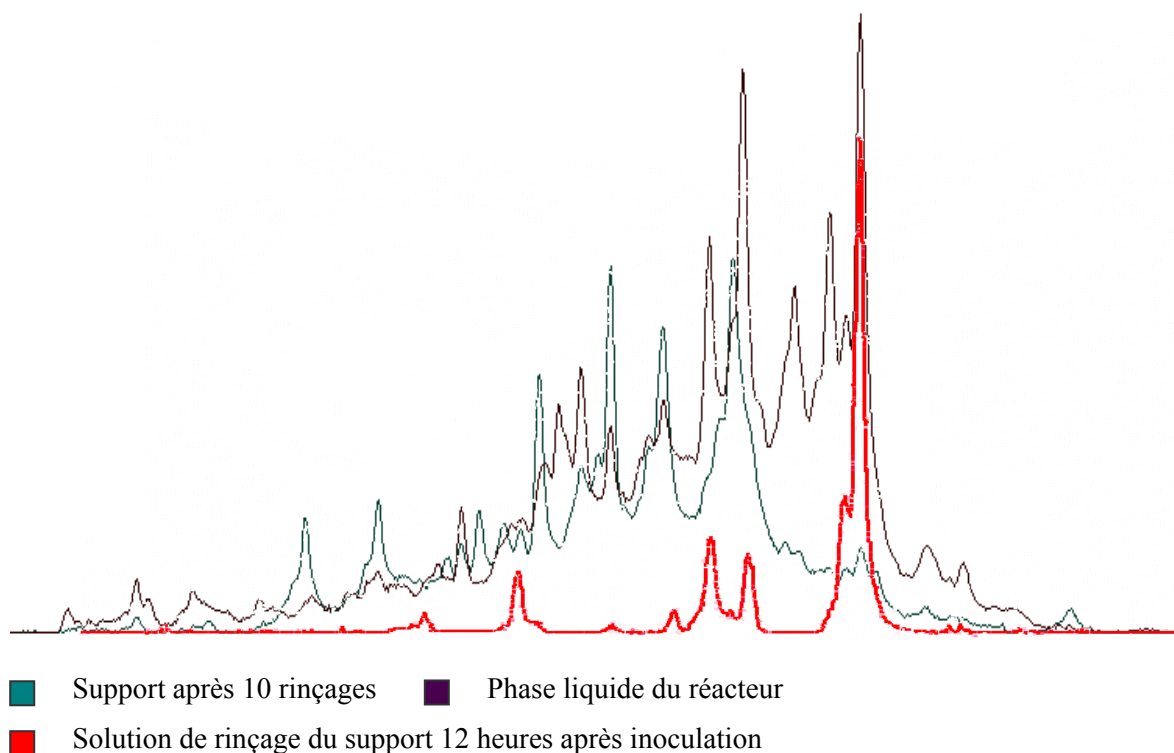


Figure III.6 : Profils SSCP réalisés à partir des particules de support et à partir de la phase liquide du réacteur prélevées 12 jours après l'inoculation et le profil SSCP réalisé à partir de la solution du 6^{ème} rinçage du support prélevé 12 heures après inoculation

III.1.3 Conclusions

Douze heures après la mise en contact de l'inoculum et du support, toutes les espèces bactériennes adhèrent au support. Cette fixation précoce et non spécifique est réversible pour certaines espèces bactériennes. En effet, un rinçage doux entraîne celles dont l'aptitude à la fixation est moindre. Douze jours après l'inoculation, certaines espèces présentes sous forme planctonique ne sont que très faiblement ou pas représentées au sein du biofilm. Il y a donc eu une adhésion préférentielle et une croissance de certaines bactéries sur le support. Concernant le démarrage des réacteurs de digestion anaérobie, la mise en évidence de la fixation précoce et non spécifique des bactéries au support, douze heures seulement après la mise en contact,

permet d'envisager que la durée de la phase d'inoculation, habituellement de quelques jours à plusieurs semaines dans certains cas, soit réduite à quelques heures.

III.2 Impact des conditions hydrodynamiques sur le démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse

L'objectif de cette étude est de connaître et de quantifier l'influence des conditions hydrodynamiques sur le démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse (durée de la montée en charge, croissance et activité du biofilm...). Deux réacteurs LTI, placés dans les mêmes conditions opératoires, ont été suivis durant toute la phase de démarrage. Le seul paramètre différent était la vitesse superficielle du gaz qui permet de fluidiser les supports dans ce type de réacteur. En effet, dans les LTI, l'attrition (chocs entre particules), qui est la principale contrainte hydrodynamique agissant sur le biofilm, est proportionnelle à la vitesse du gaz. Une fois le démarrage réalisé et les deux réacteurs stabilisés à une charge de $6 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, les mêmes conditions hydrodynamiques ont été appliquées aux deux réacteurs : une vitesse superficielle du gaz intermédiaire a été choisie ($U_g = 7 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$). L'impact de la variation des conditions hydrodynamiques sur des réacteurs stables a été analysé.

III.2.1 Conditions de démarrage

Les deux vitesses testées ont été choisies à partir des conclusions des recherches de Buffière *et al.* (Buffière *et al.* 2000b) sur des réacteurs LTI. Dans cette étude, un hydrophone placé sur la paroi externe du réacteur permet d'enregistrer les collisions des particules avec cette sonde, et donc d'accéder aux caractéristiques de l'attrition. Une étude similaire a été envisagée sur notre installation afin de quantifier cette contrainte hydrodynamique. Cependant, la taille des particules étant très petite ($d = 192 \mu\text{m}$), l'énergie libérée lors de la collision n'est pas suffisante par rapport à la sensibilité de la sonde : cette technique de mesure n'est donc pas adéquate pour notre système.

Une des conclusions majeures des travaux de Buffière, 2000b #500 est que l'attrition est globalement proportionnelle à la vitesse superficielle du gaz. Même si cette étude a été réalisée dans un LTI possédant des supports de taille de l'ordre du millimètre, nous supposons que cette conclusion est également valable pour des particules de diamètre de l'ordre de $200 \mu\text{m}$. Deux vitesses superficielles de gaz extrêmes ont été choisies : $U_g = 1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le réacteur A (R_A), $U_g = 10 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le réacteur B (R_B). La vitesse de $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ représente la vitesse minimale de fluidisation par le gaz. La vitesse de $10 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ maximise les contraintes hydrodynamiques tout en conservant un régime de bulles dispersées et une fluidisation homogène du support compatible avec la croissance du biofilm (Buffière *et al.* 1999).

La stratégie adoptée pour augmenter la CVA est la stratégie de l'épuration maximale (stratégie A) décrite au paragraphe II.2 du chapitre " Matériel et méthodes ". Durant les 96 premiers jours de la phase de démarrage, la CVA a été augmentée de $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ à $6 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ pour le R_A et $8 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ pour le R_B , pour être ensuite stabilisée à $6 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ jusqu'à la fin de cette phase expérimentale (180 jours).

Une phase d'inoculation de 12 heures a tout d'abord été réalisée. Un bon mélange de l'inoculum a été maintenu dans le réacteur grâce à une recirculation placée entre le décanteur et la tête de la colonne. Pendant la phase de montée en charge, l'alimentation en mode continu a été réglée afin de maintenir un TSH égal à 24 heures pour les deux systèmes.

III.2.2 Impact des conditions hydrodynamiques sur la phase de montée en charge

III.2.2.1 Performances épuratoires

La Figure III.7 montre l'évolution de la CVA et du rendement épuratoire durant la phase de démarrage des deux bioréacteurs. La stratégie de l'épuration maximale nécessite de fixer un rendement épuratoire seuil avant que la CVA puisse être augmentée. Nous nous sommes fixé un rendement épuratoire au moins égal à 80%.

Suite à chaque augmentation de la CVA, pour les deux réacteurs, on observe une phase d'adaptation durant laquelle le rendement épuratoire augmente progressivement jusqu'à atteindre 80%. Les deux premières augmentations de la CVA ont lieu au même moment pour les deux réacteurs : le 19^{ème} jour pour l'augmentation de $0,5$ à $1 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ et le 37^{ème} jour pour l'augmentation de 1 à $2 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Après cette seconde augmentation, le rendement épuratoire du R_B , soumis aux contraintes hydrodynamiques les plus faibles, augmente plus rapidement, et il en est de même pour les deux paliers suivants. Ainsi, le passage d'une CVA de 2 à $4 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ est réalisé avec cinq jours de décalage, et le passage d'une CVA 4 à $6 \text{ g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ avec huit jours de décalage, ce qui représente un gain de temps de plus de 10%.

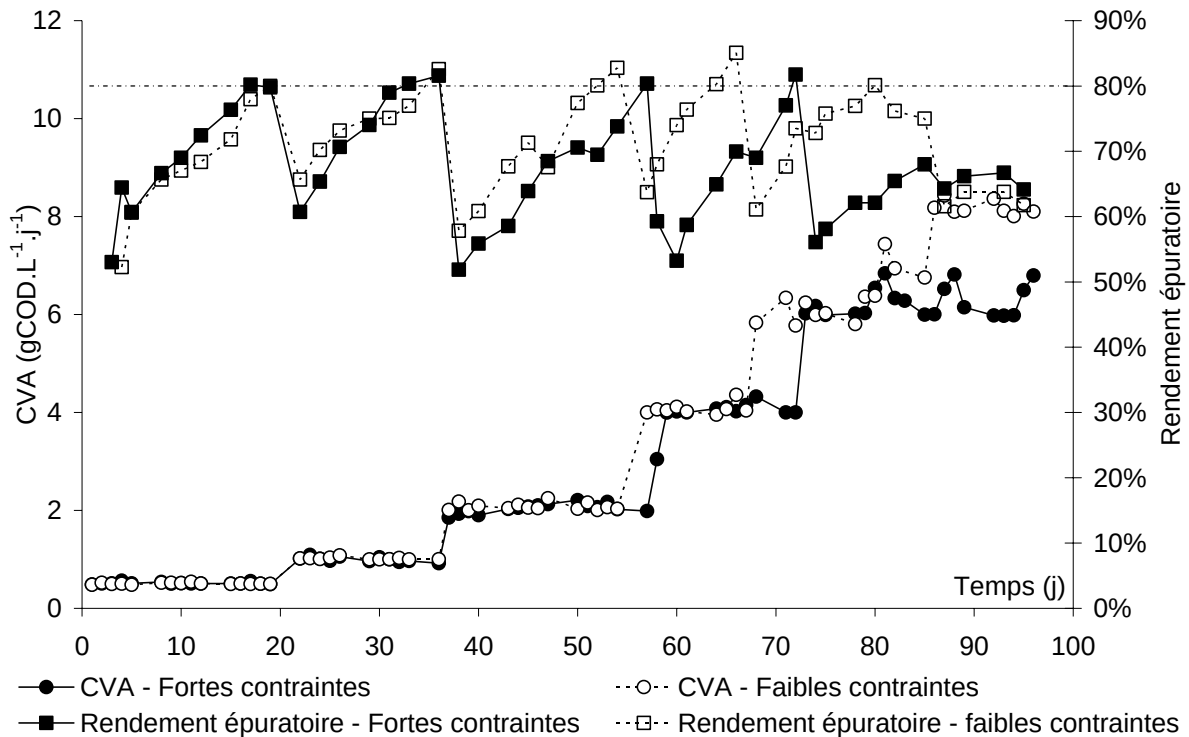


Figure III.7 : évolution du rendement épuratoire et de la charge volumique appliquée durant la phase de démarrage

Après cette augmentation de la CVA de 4 à 6 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹, le R_A à fortes contraintes hydrodynamiques semble incapable de traiter le surplus de DCO apporté : le rendement épuratoire se stabilise à 65% (Figure III.7). La DCO dégradée (Figure III.8), en constante augmentation jusqu'à ce point, se stabilise à une valeur légèrement supérieure à 4g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹.

Au contraire, le R_B semble mieux supporter l'augmentation de la CVA, et le rendement épuratoire augmente progressivement après ce dernier pallier pour atteindre 80% le 80^{ème} jour. La valeur seuil étant atteinte, la CVA du R_B est alors augmentée une dernière fois à 8 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹. Le rendement épuratoire du R_B diminue et se stabilise à 63% et la DCO dégradée par le réacteur se stabilise à 5,2g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ à partir du jour 80. La montée en charge est donc plus rapide et la quantité de DCO dégradée plus importante pour le réacteur soumis aux conditions hydrodynamiques les moins contraignantes.

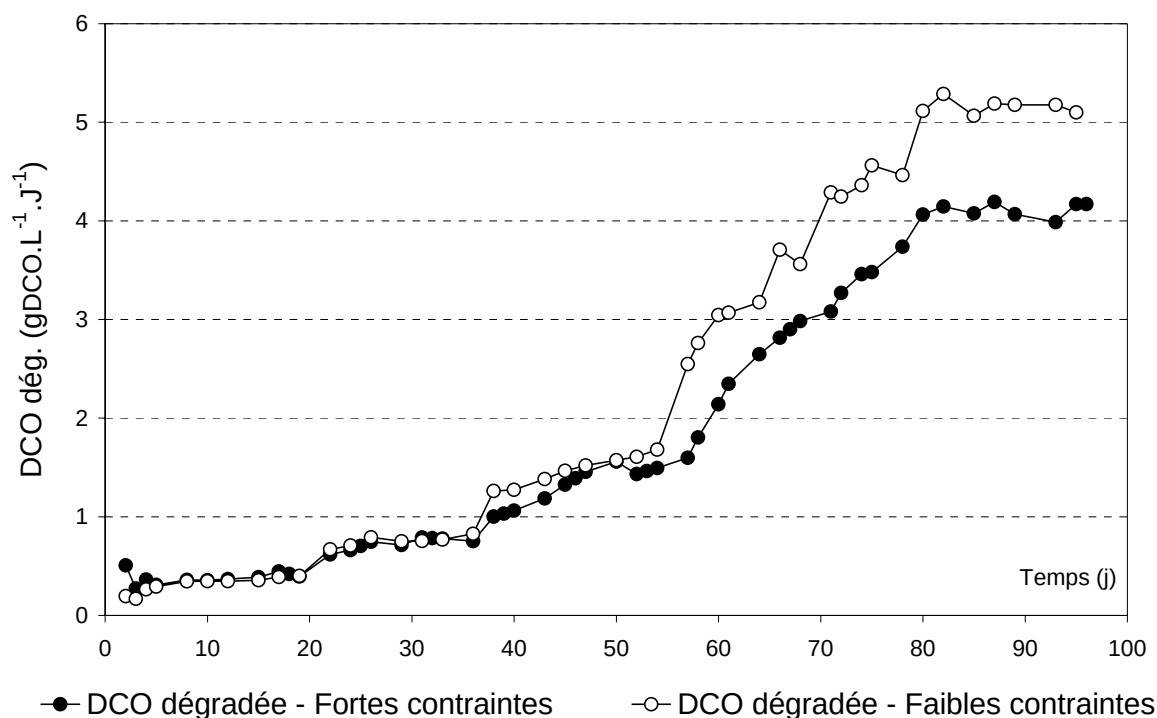


Figure III.8 : Evolution de la DCO dégradée durant la phase de démarrage

La Figure III.9 montre l'évolution du rendement en méthane durant les 96 jours de la phase de démarrage. Ce paramètre donne une indication sur l'activité méthanogène du consortium anaérobie. Durant les 18 premiers jours, ce rendement augmente puis se stabilise à des valeurs proches de $0,3 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gDCO}_{\text{deg.}}^{-1}$. Dans les conditions expérimentales (à 20°C), le calcul du volume de méthane produit par la réduction anaérobie d'une quantité d'éthanol oxydé par 1g d'oxygène donne une valeur théorique maximale du rendement méthane égale à $0,375 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gDCO}_{\text{deg.}}^{-1}$, à 25°C et à pression atmosphérique. Cette valeur maximale ne prend pas en compte le flux de carbone nécessairement dévié vers l'anabolisme pour la production de biomasse et la croissance des microorganismes. Durant les 18 premiers jours l'augmentation progressive du rendement méthane depuis des valeurs très faibles ($0,05 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gDCO}_{\text{deg.}}^{-1}$) jusqu'à des valeurs proches du maximum théorique est vraisemblablement due à une acclimation des microorganismes à leur nouveau substrat et à leur nouvel environnement.

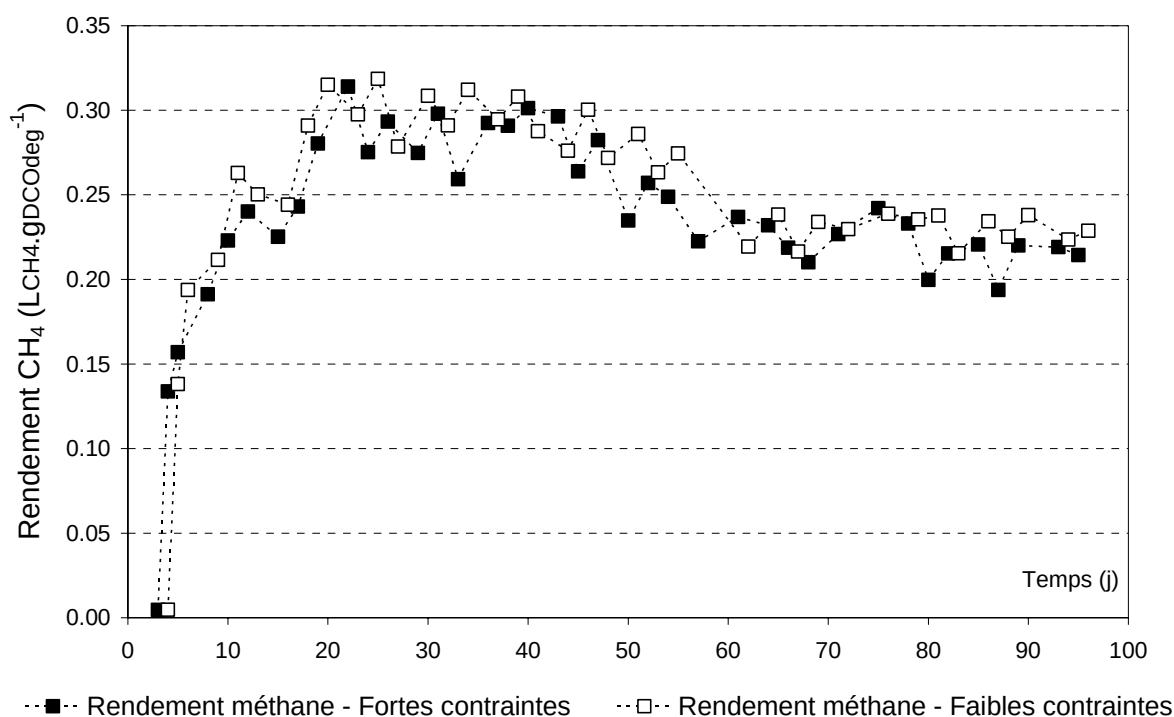


Figure III.9 : Evolution du rendement méthane durant la phase de démarrage

Elles témoignent de l'adaptation des microorganismes à leur nouveau mode de croissance fixé à un support, sous la forme d'un biofilm, qui implique la production accrue des biopolymères (EPS) responsables de l'attachement et de la cohésion du biofilm. Les faibles valeurs mesurées par la suite (inférieures aux valeurs théoriques) sont dues à la l'accumulation d'AGV.

Les résultats des bilans massiques présentés aux Figure III.10 et Figure III.11 viennent étayer ces hypothèses. Durant la période d'acclimatation (les 18 premiers jours), une quantité importante du carbone métabolisé (de 20% le dixième jour à 8% à la fin de cette phase) est déviée vers la production de biomasse qui est réalisée au détriment de la production de biogaz.

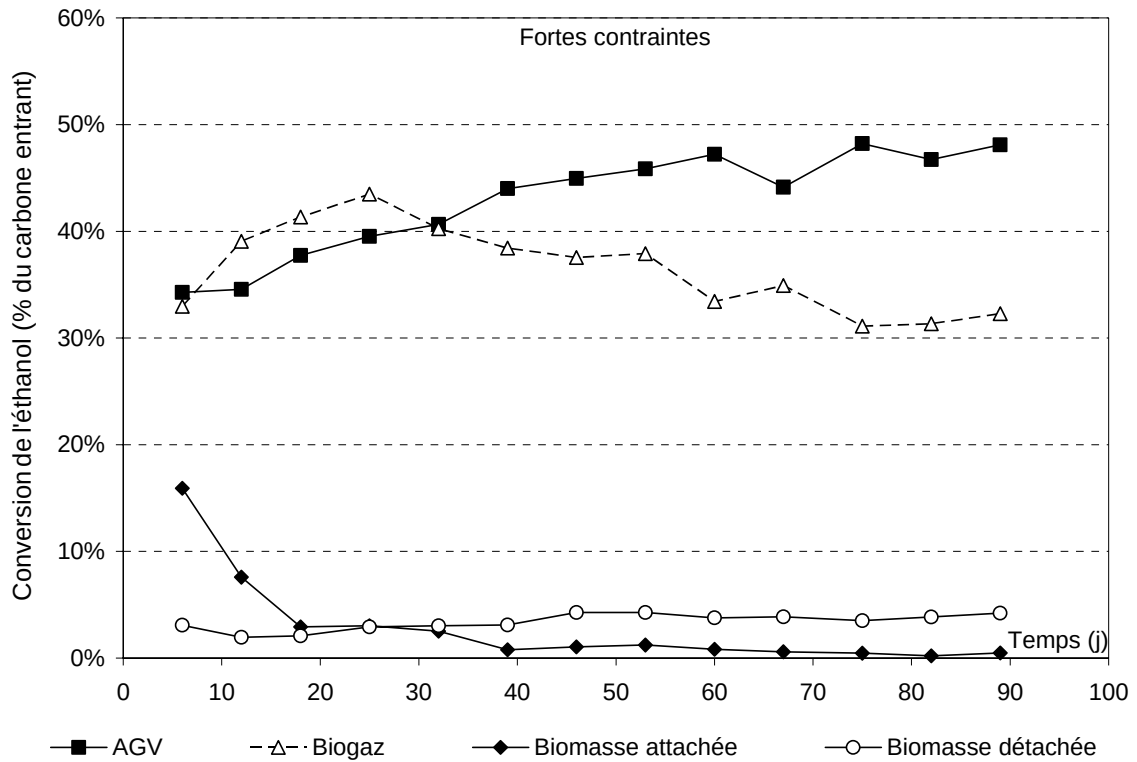


Figure III.10 : Evolution de la répartition du flux de carbone entrant dans le cas LTI à faibles contraintes

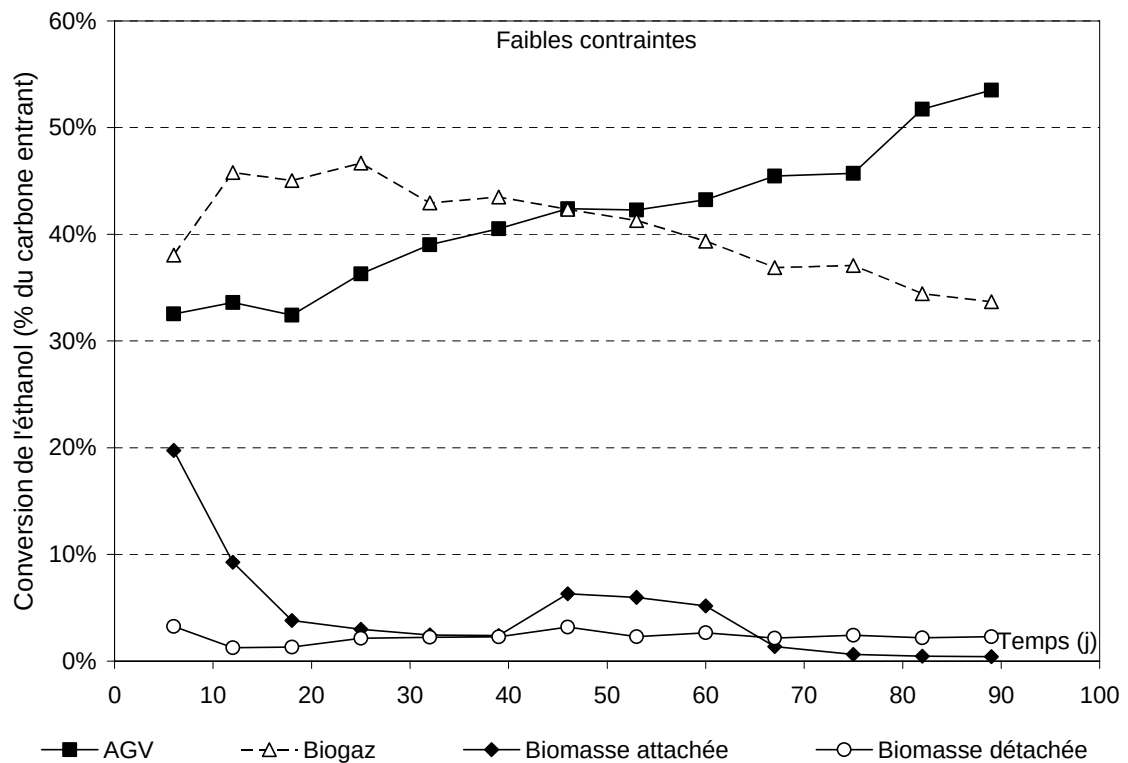


Figure III.11 : Evolution de la répartition du flux de carbone entrant dans le cas LTI à faibles contraintes

Après cette phase d'acclimatation, le rendement en méthane se stabilise entre le 18^{ème} et le 40^{ème} jour puis décroît progressivement et se stabilise à $0,24 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCOdeg}}^{-1}$ à partir du 65^{ème} jour jusqu'à la fin de la phase de démarrage. Le flux de carbone se divise principalement entre la production de biogaz et la production d'AGV. Initialement, en terme de carbone, la production de biogaz est plus importante que la production d'AGV (Figure III.10 et Figure III.11). Cette tendance s'inverse après le 32^{ème} jour pour le R_A (fortes contraintes), et après le 46^{ème} jour pour le R_B. En effet, si les voies cataboliques qui mènent à la formation de biogaz attestent d'une dégradation complète de l'éthanol, la production d'AGV indique une dégradation incomplète et signent plus particulièrement une faillite de la méthanogenèse. Cette faillite apparaît plus tôt pour le R_A soumis aux fortes contraintes hydrodynamiques. Lors d'une expérimentation ultérieure, nous mettrons en évidence que la faillite de la méthanogenèse est causée par un déficit en éléments traces métalliques, et en particulier par une limitation en cobalt et nickel.

III.2.2.2 Développement du biofilm

L'accumulation de biofilm sur le support a été suivie durant la phase de démarrage. Les Figure III.12 et Figure III.13 présentent respectivement les variations des matières volatiles attachées (MVA) pour le réacteur à fortes contraintes hydrodynamiques et à faibles contraintes hydrodynamiques. Les variations des taux de production, de détachement et d'accumulation de biomasse sont également tracées. Le taux d'accumulation est mesuré directement par l'évolution temporelle des matières volatiles attachées sur le support. Le TSH généralement inférieur ou égal à 24 heures est inférieur au temps de doublement des populations des microorganismes fermentaires (essentiellement les bactéries acétogènes dégradant l'éthanol) et méthanogènes (Cf. § I.1.2). On peut postuler que la croissance de ces microorganismes sous forme planctonique est négligeable pour notre système. Par conséquent, le taux de détachement est estimé à partir de la mesure des matières volatiles en suspension (MVS) présentes dans le réacteur. Le taux de production de biomasse dans le réacteur est calculé par bilan matière, et correspond à la somme des taux de détachement et d'accumulation.

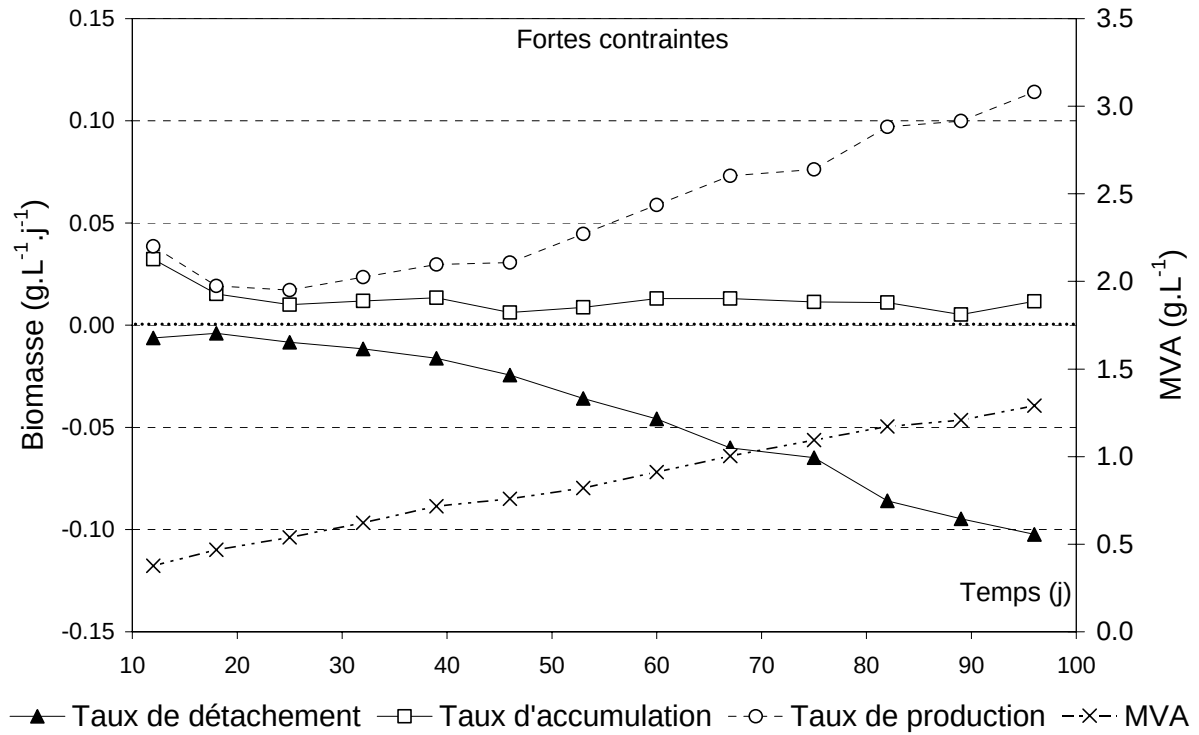


Figure III.12 : Réacteur à fortes contraintes - Production, accumulation, détachement de biomasse et évolution des MVA durant la phase de démarrage

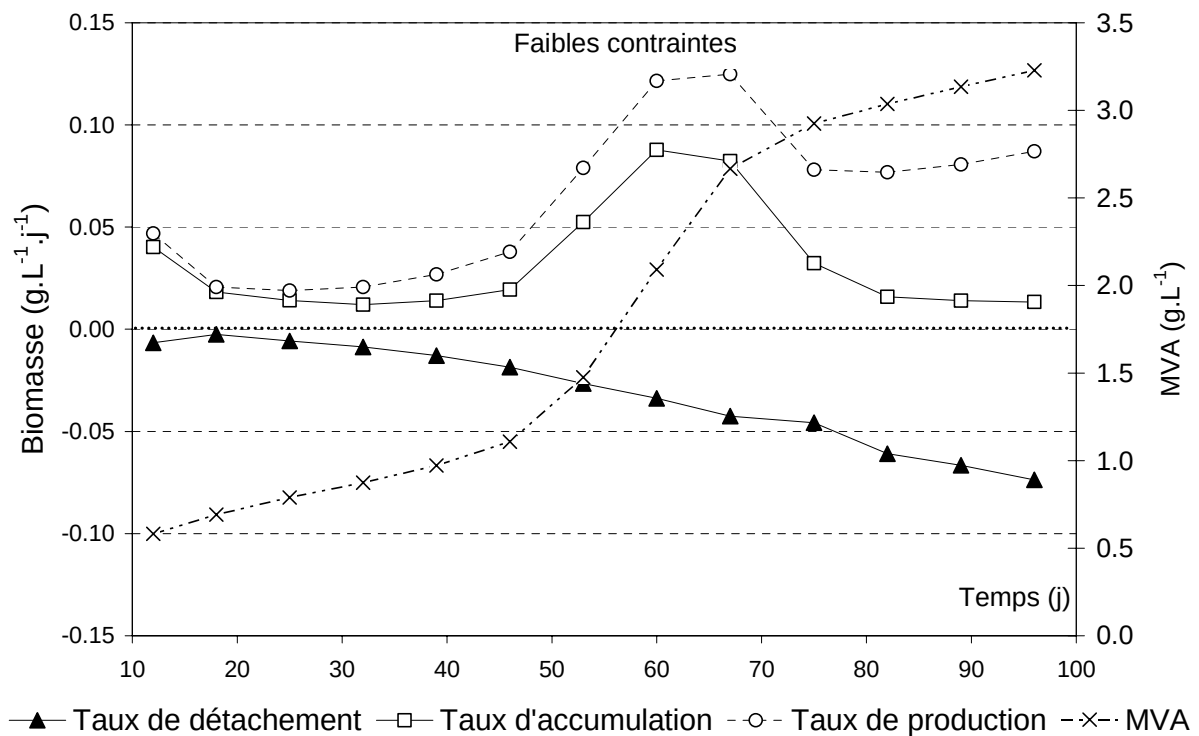


Figure III.13 : Réacteur à faibles contraintes - Production, accumulation, détachement de biomasse et évolution des MVA durant la phase de démarrage

Si l'on observe les Figure III.12 et Figure III.13, les taux de production de biomasse pour les deux réacteurs à CVA équivalentes sont similaires. La biomasse produite dans le R_A soumis aux fortes contraintes hydrodynamiques se trouve principalement sous la forme détachée, alors qu'elle est principalement sous forme attachée dans le R_B. Cette tendance du biofilm à croître dans le réacteur à faibles contraintes hydrodynamiques se maintient jusqu'au 65^{ème} jour. Ensuite, l'inhibition de la méthanogenèse et l'accumulation d'AGV qui en résulte, semblent avoir un impact négatif sur la croissance du biofilm. Cet impact est identique pour les deux systèmes. Concernant le R_B, ce déficit entraîne une inhibition de la croissance du biofilm observable à partir du 60^{ème} jour. Le taux d'accumulation qui semble ainsi dépendre des conditions trophiques décroît puis stagne après cette date.

Le taux de détachement augmente régulièrement durant les 96 premiers jours de la phase de démarrage pour atteindre des valeurs proches de 80 mg_{MVS}.L⁻¹.j⁻¹. Concernant le réacteur soumis aux fortes conditions hydrodynamiques, le taux de production de biomasse augmente régulièrement jusqu'à atteindre des valeurs comparables à celles obtenues pour R_B à CVA équivalente (*i.e.* pour une CVA de 6 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ un taux de production de 75 à 78 mg_{MV}.L⁻¹.j⁻¹). Bien que le taux d'accumulation soit limité et stagne à des valeurs comprises entre 11 et 13,5 mg_{MVA}.L⁻¹.j⁻¹, le taux de détachement augmente jusqu'à atteindre des valeurs élevées supérieures à 100 mg_{MVS}.L⁻¹.j⁻¹.

A la fin des 96 jours de la phase de démarrage, l'observation du support au microscope à transmission (Figure III.14) confirme les résultats obtenus par la mesure des MVA (Figure III.12 et Figure III.13). La masse de biofilm retenue sur le support soumis aux faibles contraintes hydrodynamiques est plus importante que celle accumulée sur le support soumis aux fortes contraintes hydrodynamiques.

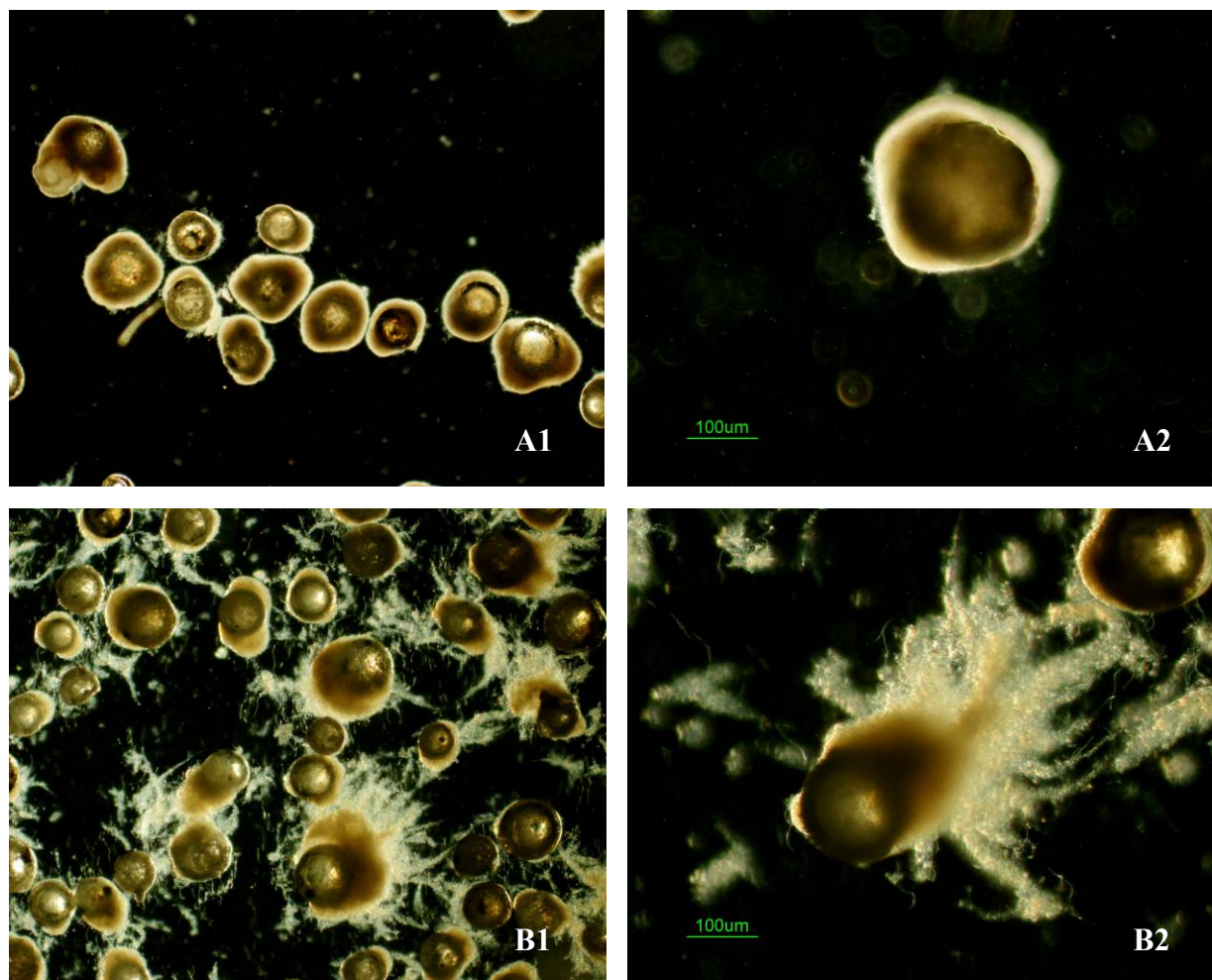


Figure III.14 : support colonisé au jour 80. Réacteur à fortes contraintes hydrodynamiques (A), réacteur à faibles contraintes hydrodynamiques (B), grossissement x10 (1) x 40 (2)

III.2.2.3 Activité du biofilm

L'activité spécifique du biofilm dont l'évolution peut être représentée à la Figure III.15 a pu être calculée à partir de la quantification du biofilm et de la mesure de la DCO dégradée pour chaque réacteur durant la phase de démarrage. Elle est plus de deux fois supérieure pour le biofilm qui s'est développé sous de fortes conditions hydrodynamiques, soit $3,5 \text{ g}_{\text{DCOdeg.}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_A contre $1,7 \text{ g}_{\text{DCOdeg.}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_B . Ces valeurs d'activité spécifiques demeurent élevées en comparaison aux valeurs mesurées dans les réacteurs anaérobies à forte charge à biomasse fixée pour lesquels l'activité spécifique varie classiquement entre $0,8$ et $1 \text{ g}_{\text{DCOdeg.}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ (Henze *et al.* 1983). Les réacteurs anaérobies à lit turbulent inverse permettent le développement d'un biofilm fin et actif, dont la croissance est limitée par les contraintes hydrodynamiques qui génèrent des taux de détachement élevés, même lorsque les contraintes hydrodynamiques appliquées sont faibles.

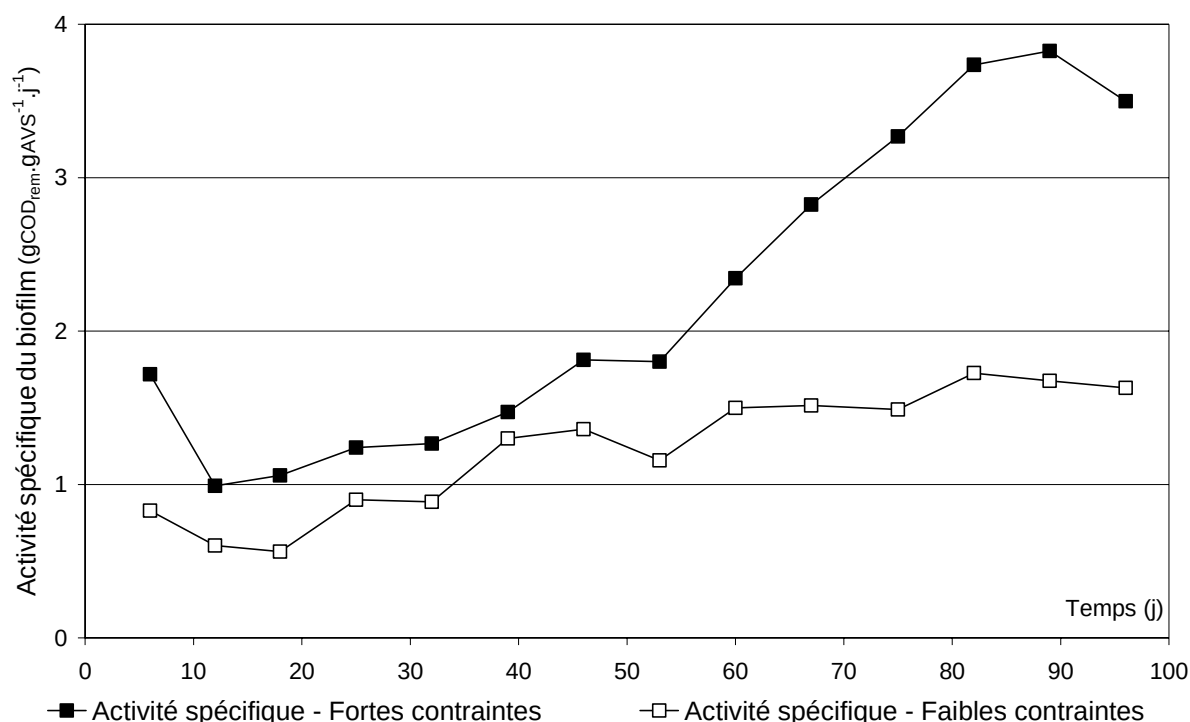


Figure III.15 : Evolution de l'activité spécifique pour chaque réacteur durant la phase de démarrage

III.2.3 Egalisation des contraintes hydrodynamiques

A partir de la fin de la phase de démarrage (96^{ème} jour), la CVA des deux réacteurs a été maintenue à $6 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ jusqu'à l'obtention de conditions stables en terme de croissance du biofilm et de performances épuratoires. Au 189^{ème} jour, la vitesse de recirculation du gaz a été égalisée à $U_g = 7 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les deux réacteurs. Les MVS et les MVA ont été mesurées pour chaque système durant 30 jours après égalisation des vitesses de gaz, et les taux de production, de détachement et d'accumulation ont pu être estimés au cours de cette phase transitoire (Figure III.16 et Figure III.17). Pour le réacteur initialement soumis aux faibles contraintes hydrodynamiques, un accroissement du taux de détachement à $150 \text{ mg}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ a eu lieu immédiatement après l'augmentation de la vitesse de gaz de 1 à $7 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Cependant, le taux de détachement s'est rétabli très rapidement à des valeurs comparables à celles observées avant la perturbation (Figure III.17). Basée sur les valeurs moyennes du taux de détachement avant l'égalisation des vitesses de gaz, la quantité de biomasse détachée durant cette phase transitoire (2,3g de MVS entre le jour 190 et le jour 198) a été calculée. Elle représente seulement 3,1% de la masse totale de biofilm fixé sur le support au jour 189. Le détachement de biomasse généré par l'augmentation des contraintes hydrodynamiques est donc très faible. L'augmentation apparente du taux de production observable à la Figure III.17 entre les jours 190 et 200, ne représente pas un phénomène d'augmentation de la croissance

de la biomasse, elle est due à la mesure de la biomasse détachée durant la phase transitoire qui suit l'augmentation de la vitesse de gaz.

Considérons maintenant le réacteur initialement soumis aux fortes contraintes hydrodynamiques. Le taux de détachement (Figure III.17), stabilisé à $200 \text{ mg}_{\text{MVS}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ avant diminution de la vitesse de gaz a décliné régulièrement jusqu'à atteindre des valeurs proches de $110 \text{ mg}_{\text{MVS}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$. De plus, le taux d'accumulation dont les valeurs étaient faibles avant la diminution de la vitesse de gaz (de 5 à $11 \text{ mg}_{\text{MVS}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$) augmente significativement pour atteindre des valeurs supérieures à $90 \text{ mg}_{\text{MVS}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

La comparaison des deux systèmes montre que les taux d'accumulation et de détachement convergent après égalisation des vitesses de gaz vers des valeurs similaires, pour les deux réacteurs à la fin de l'expérimentation. Les taux de production, après une phase de transition – qui ne reflète pas les conditions réelles de croissance – se stabilisent eux aussi à des valeurs équivalentes pour les deux réacteurs.

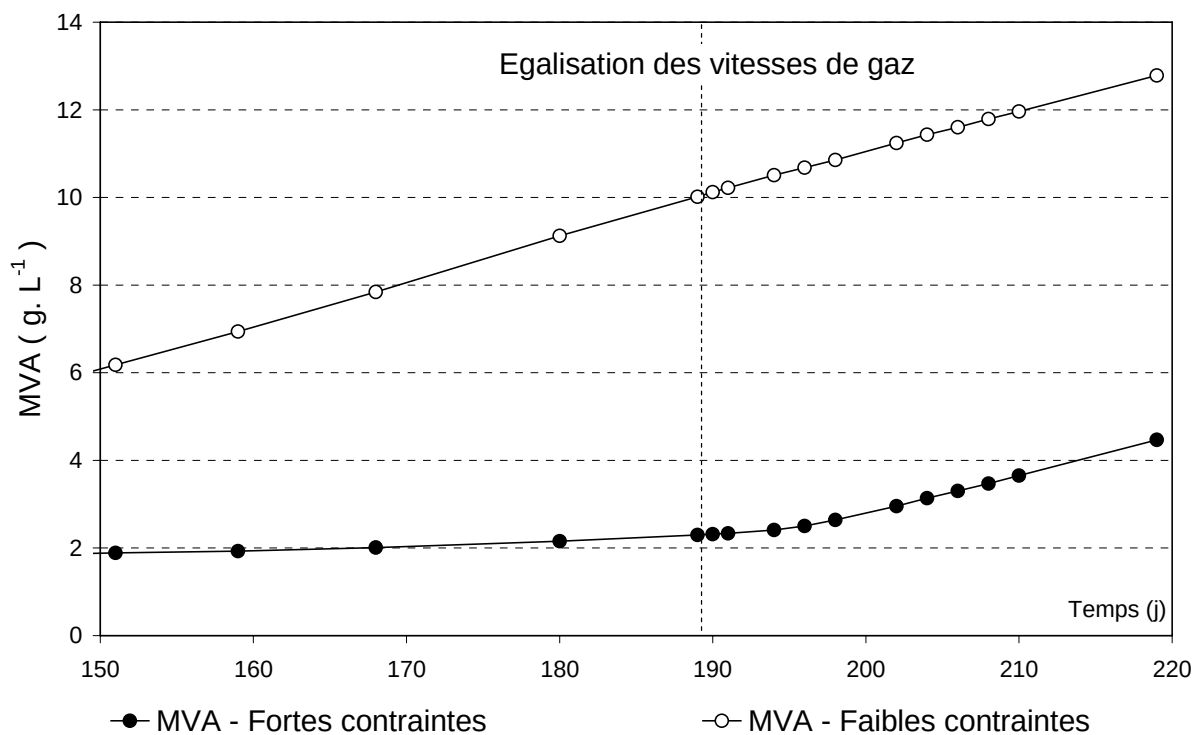


Figure III.16 : Evolution des MVA lors de l'égalisation des vitesses de gaz

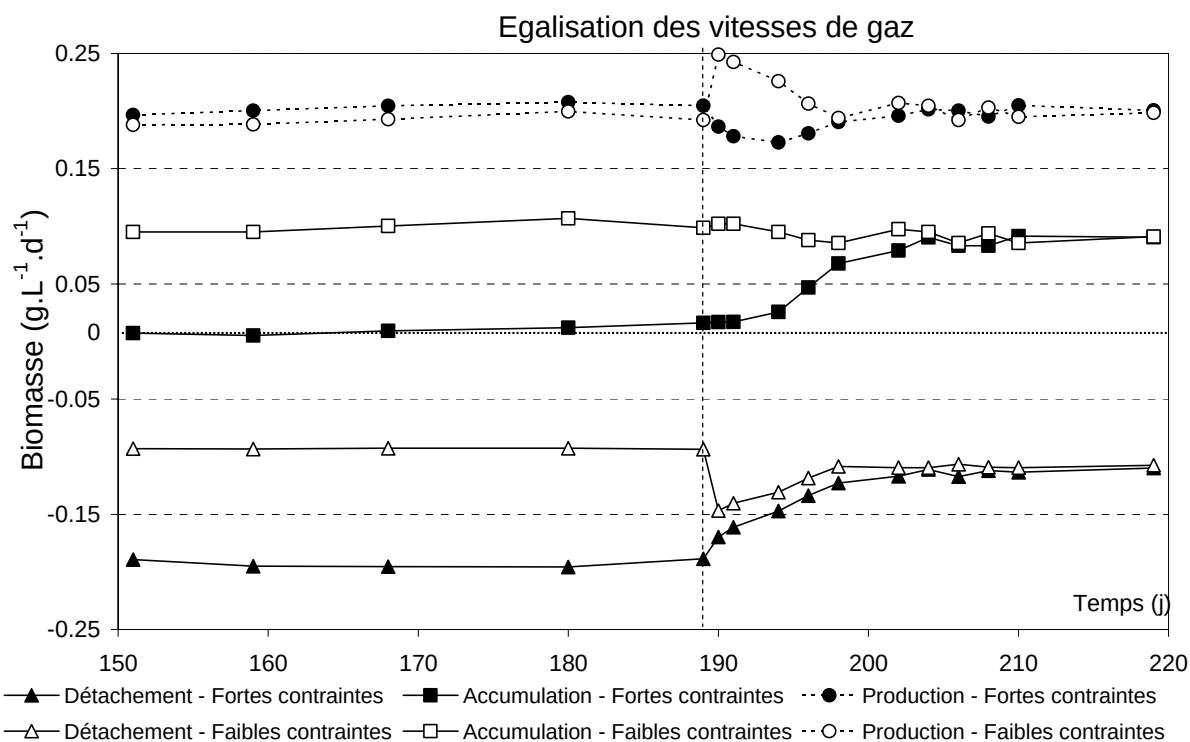


Figure III.17 : Taux de production, d'accumulation et de détachement de biomasse lors de l'égalisation des vitesses de gaz

III.2.4 Conclusions

La limitation des contraintes hydrodynamiques durant la phase de démarrage des LTI permet de traiter une quantité plus importante de pollution et d'atteindre plus rapidement une efficacité de traitement plus importante. Concernant le développement du biofilm, l'application de contraintes hydrodynamiques faibles favorise l'accumulation de biomasse fixée au support.

Par ailleurs, les fortes contraintes hydrodynamiques générées par une vitesse de recirculation du gaz élevée ralentissent la formation du biofilm mais permettent d'atteindre des valeurs d'activité spécifique élevées. De plus, les résultats obtenus après égalisation de la vitesse de gaz prouvent que l'augmentation importante des contraintes hydrodynamiques (vitesse de gaz) dans un réacteur initialement soumis à des contraintes hydrodynamiques plus faibles n'entraîne qu'un décrochement d'une très petite quantité de biofilm qui n'est pas préjudiciable aux performances du réacteur.

Le développement du biofilm est cependant fortement dépendant de la vitesse de gaz qui régule les contraintes hydrodynamiques et fixe les taux de détachement et d'accumulation. La vitesse de gaz représente un paramètre clé pour éviter le problème majeur de sur-

colonisation et de perte de support qu'ils entraînent, en particulier pour les procédés à très forte charge.

Par conséquent, il peut être ainsi recommandé de démarrer les réacteurs LTI en appliquant, durant la phase de montée en charge, de faibles contraintes hydrodynamiques afin de faciliter le développement d'un biofilm. Dans un second temps, il est souhaitable d'augmenter les contraintes hydrodynamiques lorsqu'une quantité suffisante de biomasse est accumulée sur le support, afin de contrôler l'épaisseur du biofilm, d'augmenter son activité spécifique et d'optimiser les performances du réacteur. L'augmentation de la vitesse de gaz ne pouvant éliminer de manière significative le biofilm formé, elle doit être envisagée en temps que procédure préventive et non curative.

III.3 Comparaison des stratégies de l'épuration maximale (A) et de la charge maximale (B) et influence de la composition du milieu en éléments traces lors du démarrage de réacteurs à lit turbulent inverse

Nous avons comparé deux stratégies de montée en charge pour le démarrage de deux LTI :

- la *stratégie A* ou stratégie de l'épuration maximale (stratégie conventionnelle) basée la mesure du rendement épuratoire,
- la *stratégie B* ou stratégie de la charge maximale, plus agressive, basée sur l'analyse dynamique de la réponse du consortium méthanogène en terme de production de biogaz lorsqu'il est soumis à une brève augmentation de la CVA.

L'objectif était d'évaluer l'impact de ces deux stratégies sur la formation et l'activité du biofilm anaérobie ainsi que sur la durée de la phase de démarrage. Deux LTI identiques, placés dans les mêmes conditions opératoires (même TSH, même taux de remplissage solide, même vitesse de recirculation du gaz ($U_g=1\text{mm.s}^{-1}$)), ont été suivis durant 86 jours jusqu'à l'obtention d'une CVA de $20\text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et d'un taux d'épuration supérieur à 80%. La montée en charge, marquée par la mise en évidence d'une carence nutritionnelle de l'alimentation a été divisée en quatre phases successives : I) une phase initiale d'acclimatation, II) une seconde phase de montée en charge et de croissance en conditions limitantes, III) une troisième phase de ralentissement due à un déficit en nutriments, IV) une dernière phase de croissance sans limitation nutritionnelle après complémentation de l'alimentation en micronutriments.

Les résultats vont être traités successivement pour ces quatre étapes. L'analyse peut tout d'abord être initiée à partir des bilans massiques suivant la montée en charge présentés par les Figure III.18 et Figure III., dans le cas de la stratégie A et la stratégie B, respectivement. La ligne pointillée des 100% représente la totalité du carbone organique apporté par l'alimentation sous forme d'éthanol. La somme de toutes les fractions organiques mesurées dans la phase liquide (bicarbonate, AGV), sous forme solide (MVS et MVA) et sous forme gazeuse (méthane et dioxyde de carbone) résulte de la transformation de l'éthanol par les microorganismes. Elle varie entre 89 et 100% du carbone entrant pour les deux réacteurs durant toute la durée de l'expérimentation. Ce recouvrement élevé permet de valider les résultats obtenus lors du calcul des bilans massiques. Les Tableau III.2 et Tableau III.3 présentent les valeurs de chaque terme du bilan du carbone organique pour chaque phase du démarrage.

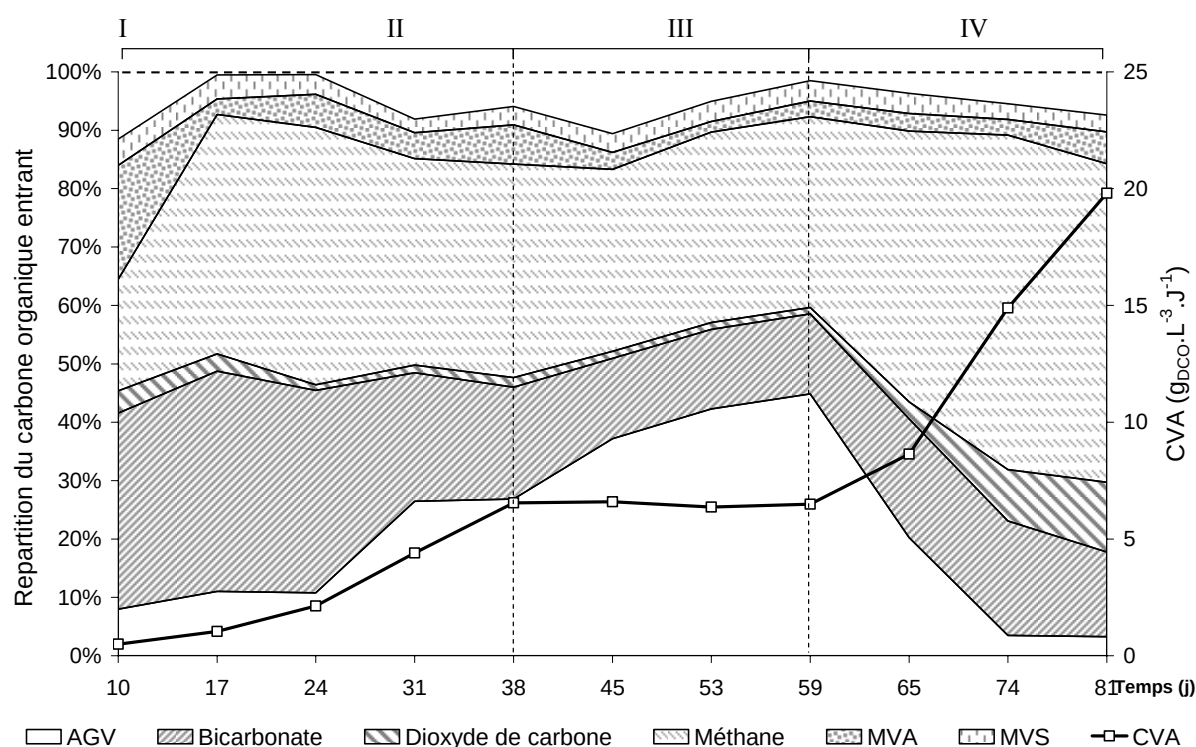


Figure III.18 : Stratégie A - Répartition des différentes formes de carbone organique produites en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol et évolution de la CVA

Tableau III.2 : Stratégie A – Bilan matière du carbone organique au cours de chaque période en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol

Phase	Durée (j)	AGV	Bicarbonate	CH ₄	CO ₂	MVA	MVS	Total
I	10	8,0%	35,6%	19,1%	3,8%	19,5%	4,5%	90,5%
II	28	23,2%	23,8%	37,5%	1,5%	5,4%	2,6%	94,1%
III	21	41,3%	13,7%	32,2%	1,1%	2,4%	3,4%	94,1%
IV	22	6,1%	17,4%	54,3%	9,3%	4,0%	2,9%	94,0%
Total	81	18,6%	17,6%	45,1%	5,7%	3,9%	3,1%	94,1%

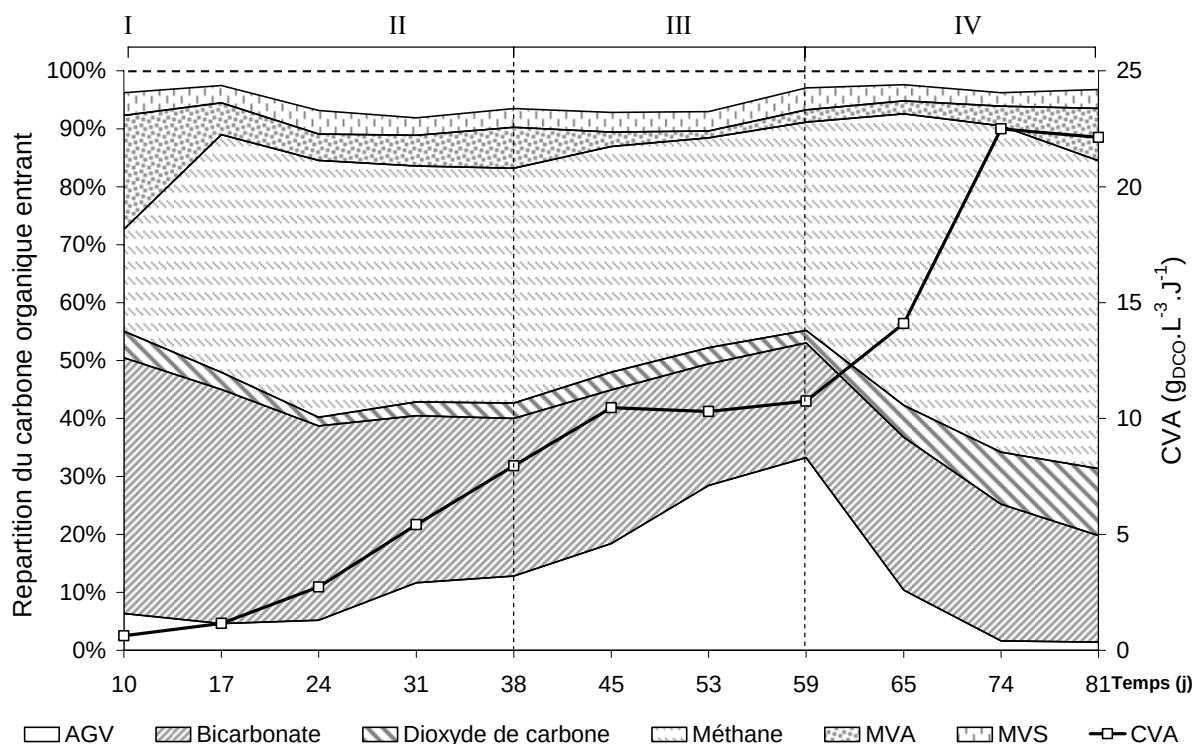


Figure III.19 : Stratégie B - Répartition des différentes formes de carbone organique produites en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol et évolution de la CVA

Tableau III.3 : Stratégie B – Bilan matière du carbone organique au cours de chaque période en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol

Phase	Durée (j)	AGV	Bicarbonate	CH ₄	CO ₂	MVA	MVS	Total
I	10	6,3%	44,2%	17,6%	4,6%	19,7%	3,9%	96,3%
II	28	11,0%	29,3%	41,1%	2,4%	6,1%	3,2%	93,2%
III	21	27,1%	22,2%	36,9%	2,7%	1,9%	3,5%	94,2%
IV	22	3,1%	22,1%	53,0%	9,4%	5,4%	2,8%	95,7%
Total	81	11%	23,3%	47%	6,4%	4,6%	3,1%	95,5%

III.3.1 Phase I : acclimatation

Durant cette première phase, dans le cadre de la stratégie B, les très faibles débits de biogaz (de 5 à 10 mL.h⁻¹) dus à la faible charge appliquée ainsi qu'à l'acclimatation des microorganismes, ne permettent pas d'obtenir de réponse aux impulsions de CVA, mesurable et exploitable compte tenu du type de débit mètre utilisé. Ainsi, pour toute la durée de cette phase d'acclimatation, la stratégie B ne peut pas être appliquée et la montée en charge du R_B est contrôlée selon la stratégie de l'épuration maximale (A). Les deux réacteurs peuvent ici être considérés comme des duplicats. Les rendements épuratoires des deux réacteurs

augmentent progressivement pour atteindre des valeurs supérieures à 90%, compatibles avec l'augmentation de la CVA le dernier jour de cette première phase. La CVA est donc augmentée de 0,5 à 0,9 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ le 10^{ème} jour pour le R_A et le R_B . Les deux réacteurs étant soumis strictement aux mêmes conditions opératoires, aucune différence significative entre les deux réacteurs n'est observée durant les 10 premiers jours.

L'alimentation en continu avec un TSH de 24 h permet le lessivage rapide des microorganismes planctoniques apportés par l'inoculum et qui n'ont pas adhéré au support. Après trois jours de fonctionnement, 95% des MVS sont lessivées ou ont sédimenté dans les décanteurs situés à la base des réacteurs. Seuls se maintiennent dans le procédé les microorganismes qui ont adhéré en formant la première "couche" du biofilm à la surface du support. Comme pour la précédente étude, cette première phase est d'une durée de 10 jours et correspond à une période d'acclimatation des microorganismes à leur nouvel environnement et leur nouveau substrat. Comme on peut l'observer sur les Figure III.18 et Figure III., le flux de carbone dédié à la production de biomasse (fixée sous forme de biofilm (MVA) et détachée (MVS)), représente plus de 25% du carbone organique entrant. Ce pourcentage significatif traduit une orientation du métabolisme cellulaire vers la croissance et la production de biomasse principalement sous forme fixée, avec un pourcentage de l'ordre de 20%.

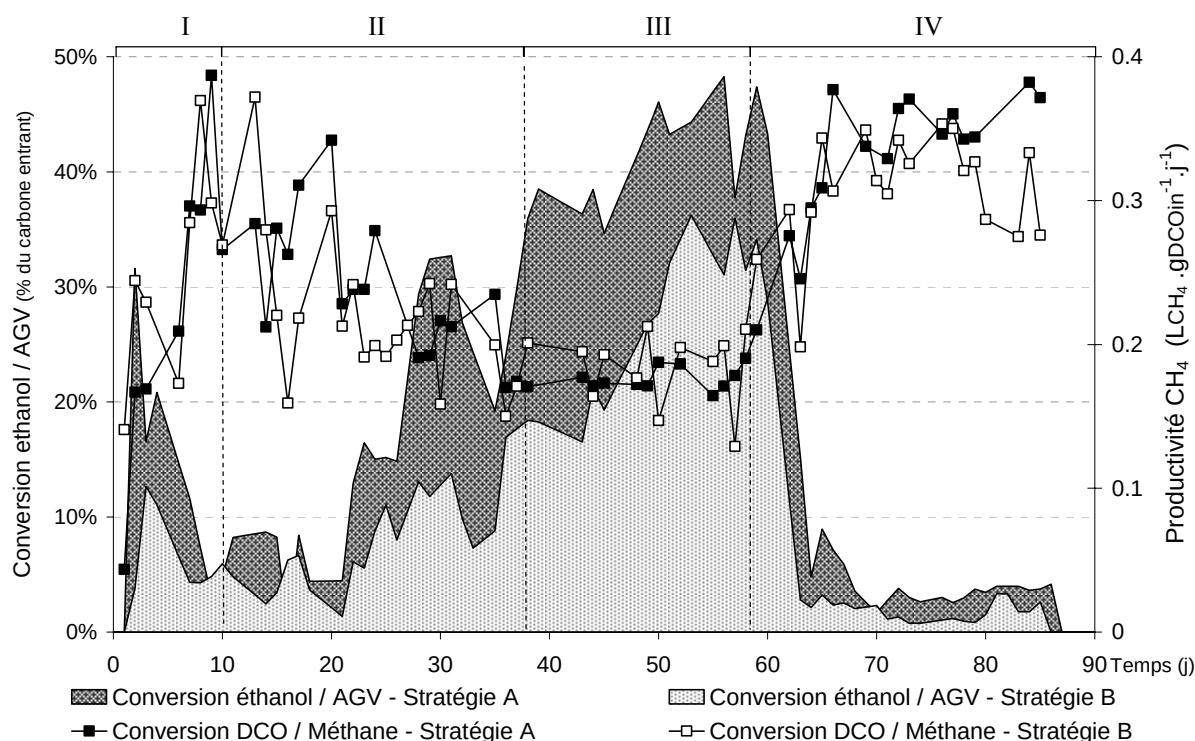


Figure III.20 : Pourcentage de conversion de l'éthanol en AGV et évolution du rendement de conversion en méthane

Il faut également considérer qu'une partie de cette biomasse libre apportée lors de l'inoculation s'est attachée et ne résulte pas d'une croissance à partir du substrat alimenté pendant cette période. L'adaptation des microorganismes à leur nouveau substrat nécessite l'activation des voies métaboliques adaptées, et de plus, durant cette phase initiale les cellules produisent les substances polymériques extracellulaires (EPS) nécessaires à leur adhésion. Cette adaptation des microorganismes à leur nouvel environnement et à leur nouveau mode de croissance a lieu au dépend de la production de biogaz. En conséquence, de valeurs faibles du rendement de conversion de la DCO en méthane, inférieures à $0,2 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCO}_{\text{in}}}^{-1}$, sont mesurées (Figure III.20) Cette tendance du rendement de conversion en méthane est également constatée par Michaud *et al.* (Michaud 2001) dans leurs travaux menés des réacteurs de digestion anaérobie à lit turbulent inverse.

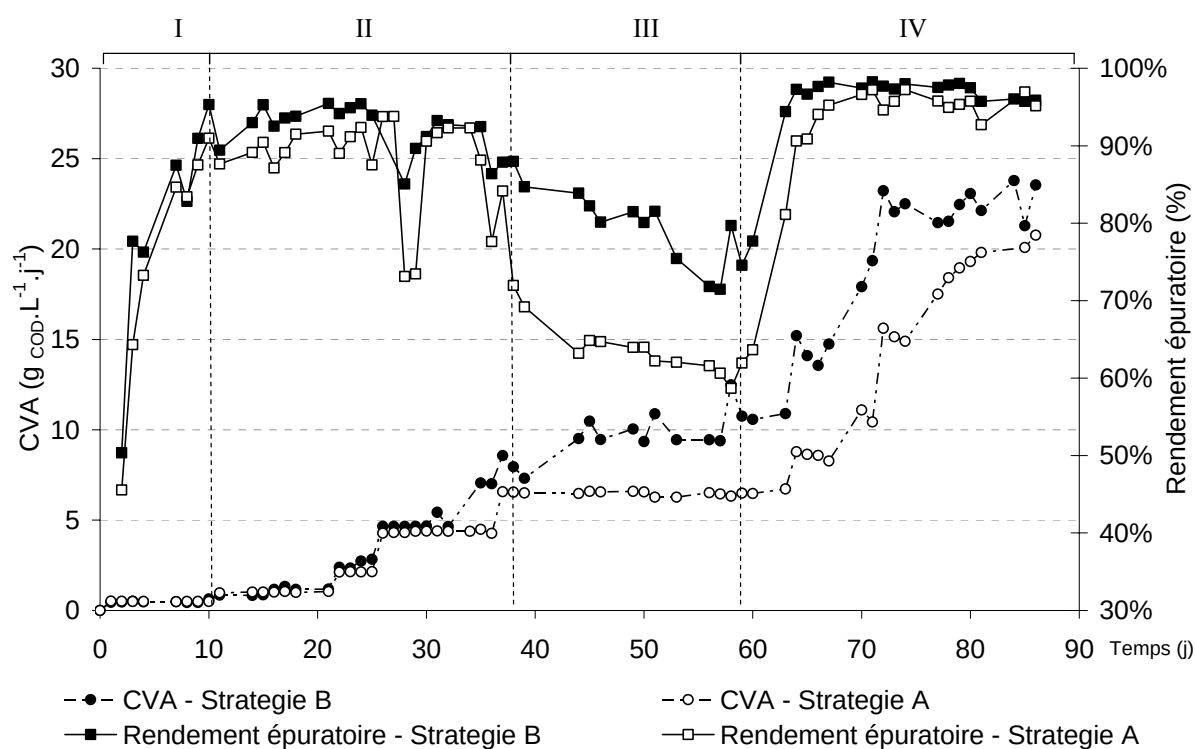


Figure III.21 : Evolution de la CVA et du rendement épuratoire

Durant les dix premiers jours, le rendement épuratoire augmente rapidement pour atteindre plus de 90% pour les deux réacteurs (Figure III.21). Durant cette première période, 6,3% du carbyone organique entrant sont convertis en AGV pour le réacteur soumis à la stratégie A (R_A) et 6,8% pour le réacteur soumis à la stratégie B (R_B) (Tableau III.2 et Tableau III.3). Le rendement de conversion de la DCO en méthane dont l'évolution est présentée par la Figure III.20 augmente pour atteindre des valeurs comprises entre 0,28 et

$0,38 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCOin}}^{-1}$. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Michaud *et al.* (Michaud 2001) menés sur le même type de procédé.

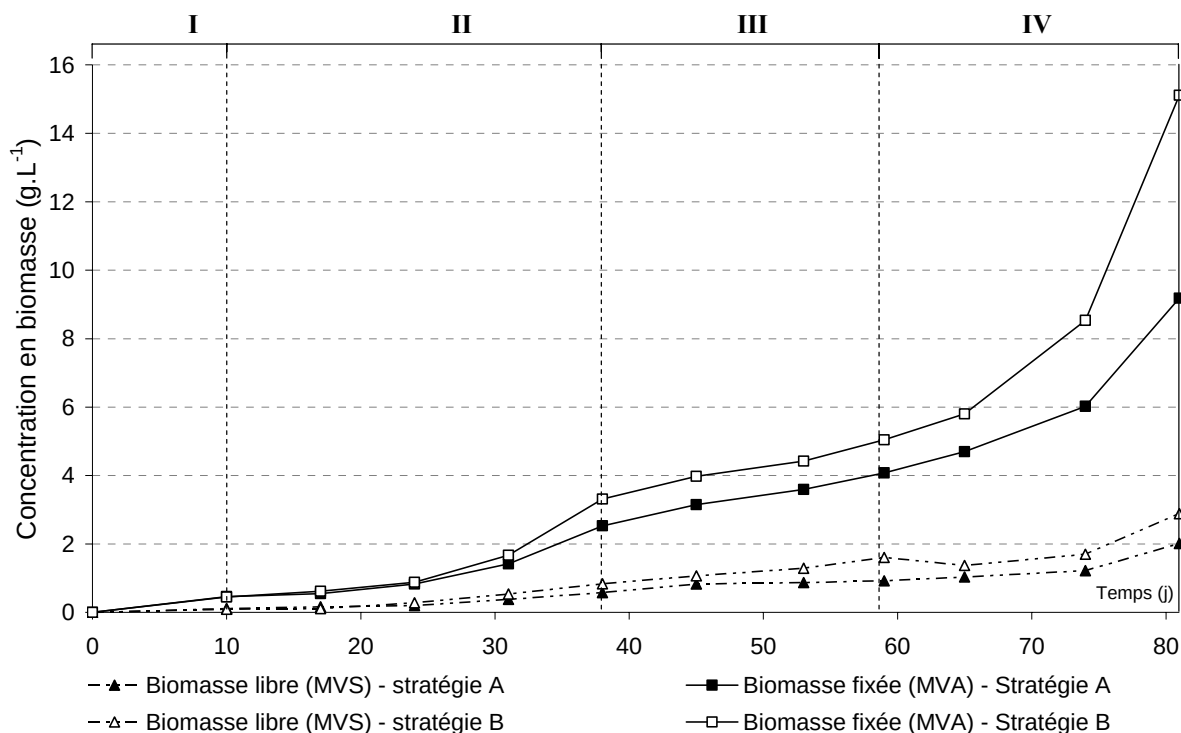


Figure III.22 : Evolution des MVA et des MES

L'évolution des concentrations en biomasse fixée (MVA) et en biomasse libre (MVS) est présentée par la Figure III.22. Au 10^{ème} jour, la concentration en biomasse fixée atteint $0,45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et la concentration en biomasse libre $0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les deux réacteurs. Comme lors de l'étude précédente, la mesure de ces paramètres permet de calculer le taux de détachement, d'accumulation et de production de biomasse dont l'évolution est présentée par les Figure III.12 et Figure III.24, respectivement pour les réacteurs A et B. A la fin de cette première phase, le taux d'accumulation de biomasse est égal à $45 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ et le taux de détachement est de l'ordre de $14 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les deux systèmes. .

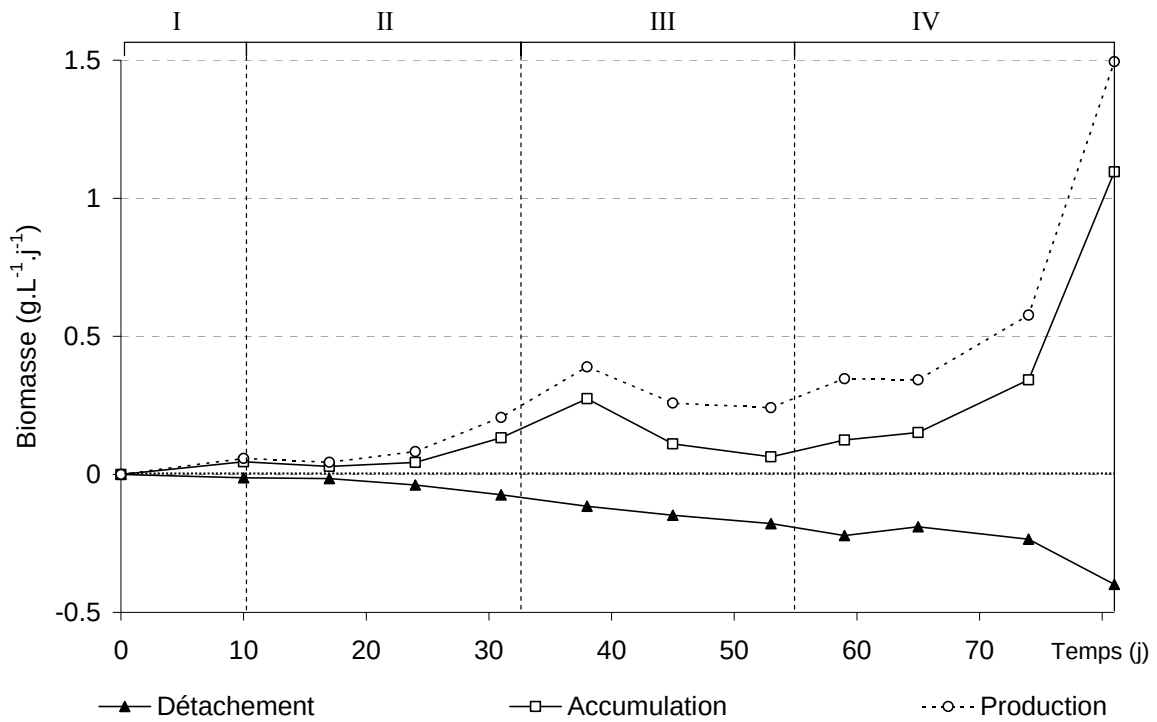


Figure III.23 : Stratégie A – Taux de production, d'accumulation et de détachement de biomasse

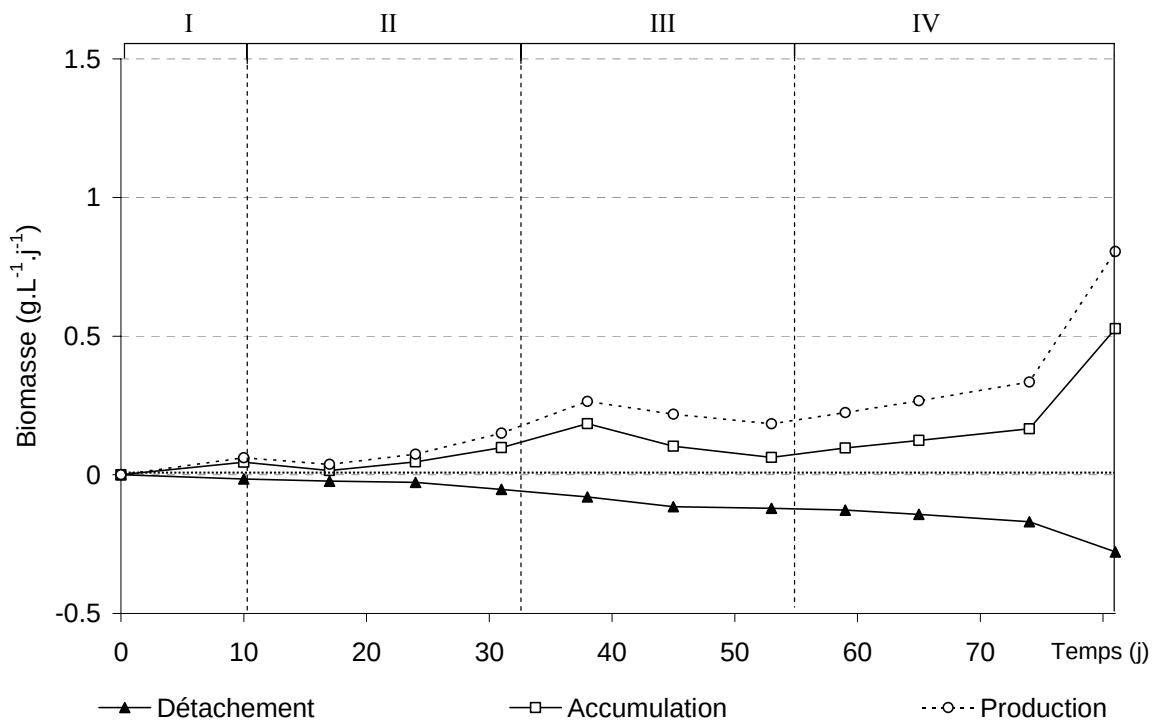


Figure III.24 : Stratégie B - Taux de production, d'accumulation et de détachement de biomasse

III.3.2 Phase II : montée en charge et croissance du biofilm en conditions limitantes

Après cette période d'acclimatation et jusqu'à la fin de la montée en charge, les débits de gaz ayant augmenté, la stratégie B peut être appliquée sur le réacteur R_B . Des impulsions de la CVA par augmentation ponctuelle du débit (augmentation d'un facteur deux à trois du débit nominal d'alimentation pendant trente minutes) sont provoquées quotidiennement. Les variations du débit de production de biogaz correspondant à ces perturbations sont enregistrées grâce au système d'acquisition en ligne du débit de gaz. L'analyse de chaque réponse exploitable implique alors l'augmentation, la stagnation ou la diminution de la CVA du R_B .

Un exemple de variation du débit de gaz en réponse à une impulsion du débit d'alimentation ayant entraîné une augmentation de la CVA est présenté sur la Figure III.25. La valeur de R_{max} est fixée à 0,5 et l'impulsion correspond à une augmentation du débit d'alimentation d'un facteur trois durant une heure. Le $V_{Théorique}$, calculé en fonction du débit de gaz avant l'impulsion est égal à 2,71L et le $V_{mesuré}$ lors de cette impulsion est égal 1,72L : R est donc égal à 0,64 et la charge peut donc être accrue. D'après l'équation (14), l'augmentation de charge, ΔCVA , découlant de cette impulsion est égale à 0,286. Ainsi, la CVA qui était égale à 6,725 $g_{DCO} \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$ avant l'impulsion est augmentée de 29%, jusqu'à 8,675 $g_{DCO} \cdot L^{-1} \cdot j^{-1}$.

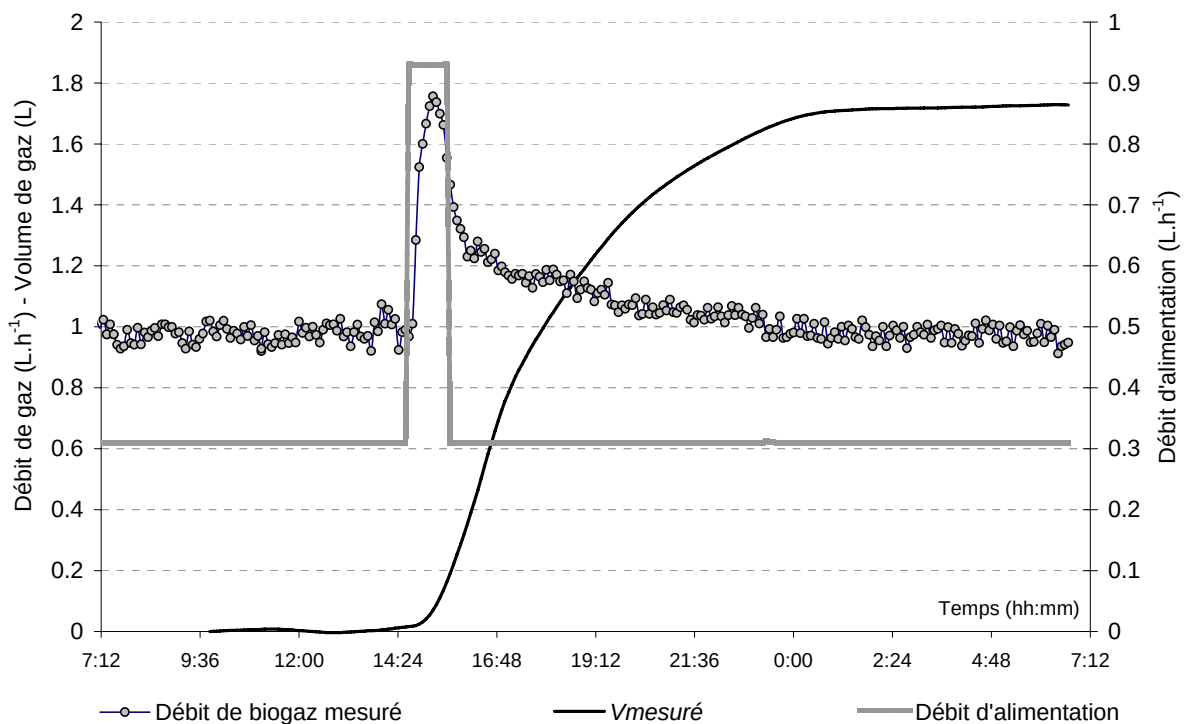


Figure III.25 : Variation du débit d'alimentation, du débit de biogaz et de $V_{mesuré}$ lors d'une impulsion de CVA réalisée le 60^{ème} jour

La Figure III.26 présente un exemple de variation du débit de gaz à la suite d'une impulsion du débit d'alimentation n'ayant pas entraîné d'augmentation de la CVA. Cette "réponse négative" a eu lieu le 26^{ème} jour, 24 heures après un accroissement de la CVA de 2,83 à 4,16 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, (soit une augmentation de la CVA de 47% après une "réponse positive" à une impulsion le 25^{ème} jour). Suite à cette augmentation importante de la CVA seulement 24 heures plus tôt, le consortium méthanogène n'a pas la capacité de dégrader le surplus de carbone organique apporté lors de cette seconde impulsion. Le ratio R, calculé à partir de $V_{Théorique} = 1,29$ et de $V_{mesuré} = 0,085$, est ici égal à 0,07. Cette valeur étant comprise entre R_{max} (fixé à 0,5) et R_{min} (fixé à 0,01), la CVA est maintenue constante.

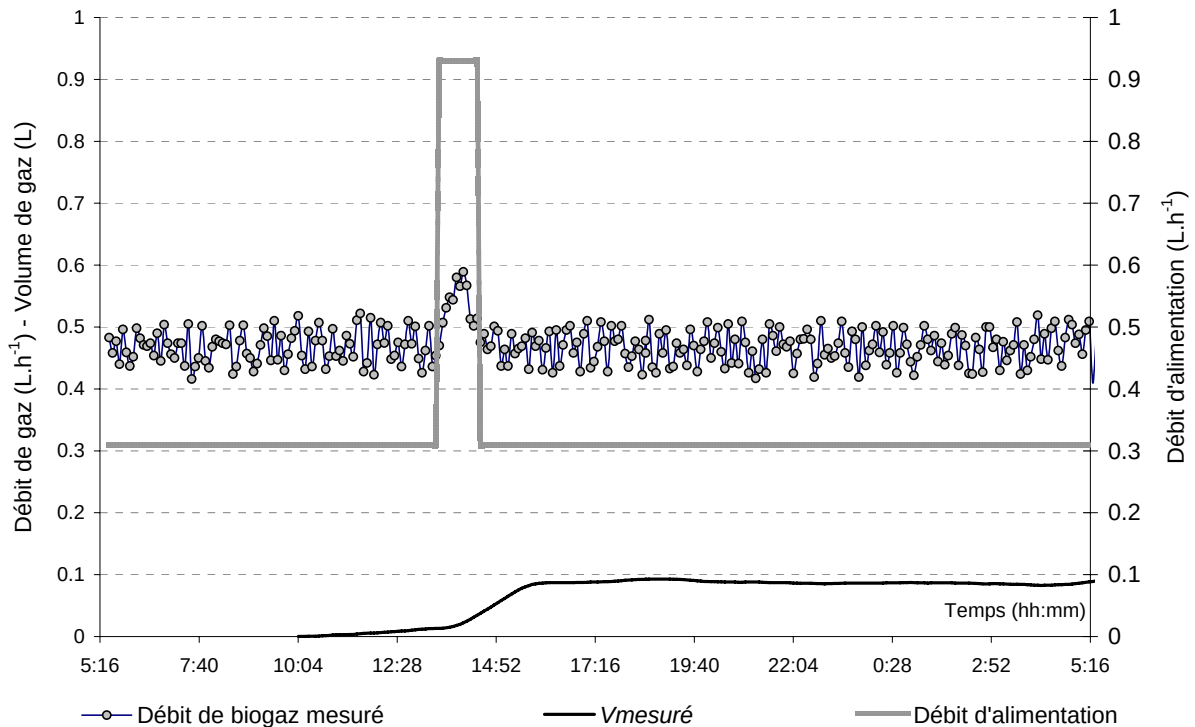


Figure III.26 : Variation du débit d'alimentation, du débit de biogaz et de $V_{mesuré}$ lors d'une impulsion de CVA réalisée le 26^{ème} jour

Durant les 18 jours de cette seconde phase, sept des dix impulsions de CVA réalisées fournissent des résultats exploitables et la CVA du R_B est augmentée 4 fois, les 16^{ème}, 22^{ème}, 26^{ème}, et 33^{ème} jours de 0,9 à 7,9 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, soit une vitesse de montée en charge égale à 0,3 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Le rendement épuratoire se maintient à des valeurs comprises entre 88 et 92%. Le R_A présente des performances similaires, avec un rendement épuratoire moyen de 87%, la CVA est augmentée lorsque le rendement épuratoire dépasse 90% selon quatre paliers successifs, les 21^{ème}, 25^{ème} et 36^{ème} jours depuis 0,9 jusqu'à 6,5 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, soit une vitesse de

montée en charge de $0,21 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Durant cette période, l'activité spécifique du biofilm augmente régulièrement (Figure III.27) de $0,7$ à $2,2 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour la stratégie A et de $1,2$ à $3 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour la stratégie B.

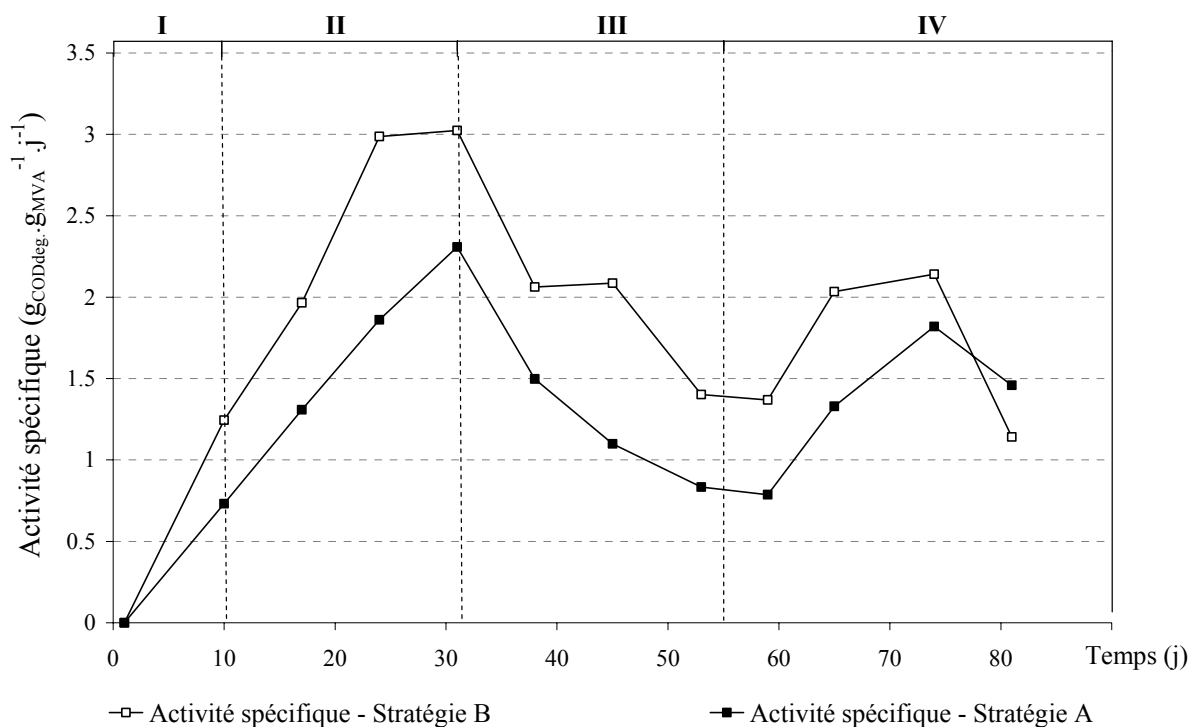


Figure III.27 : Evolution de l'activité spécifique du biofilm

L'analyse des bilans massiques représentés aux Figure III.18 et I.19 et aux Tableau III.2 I.2, montre une augmentation significative de la production d'AGV de 8 à $23,2\%$ du carbone organique entrant pour le R_A contre une augmentation de $6,3$ à 11% pour le R_B . Les Figure III.28 et Figure III.29 tracent l'évolution de la concentration des différents AGV produits par les deux réacteurs tout au long de cette étude. Comme cela a été exposé précédemment, les AGV sont des intermédiaires de la dégradation anaérobie des molécules organiques, pour cette étude, leur production résulte majoritairement de la dégradation de l'éthanol en acétate (plus de 90% de la DCO mesurée en sortie des réacteurs est sous forme d'acétate), et dans une moindre mesure propionate et butyrate. L'accumulation d'acétate est réalisée au détriment de la production de biogaz. Elle signe une dégradation incomplète de l'éthanol et en particulier une faillite de l'étape méthanogène acétoclaste, et elle peut entraîner une inhibition des *Archaea* méthanogènes, soit par diminution du pH, soit par le substrat lorsque les concentrations en AGV atteignent des valeurs trop élevées.

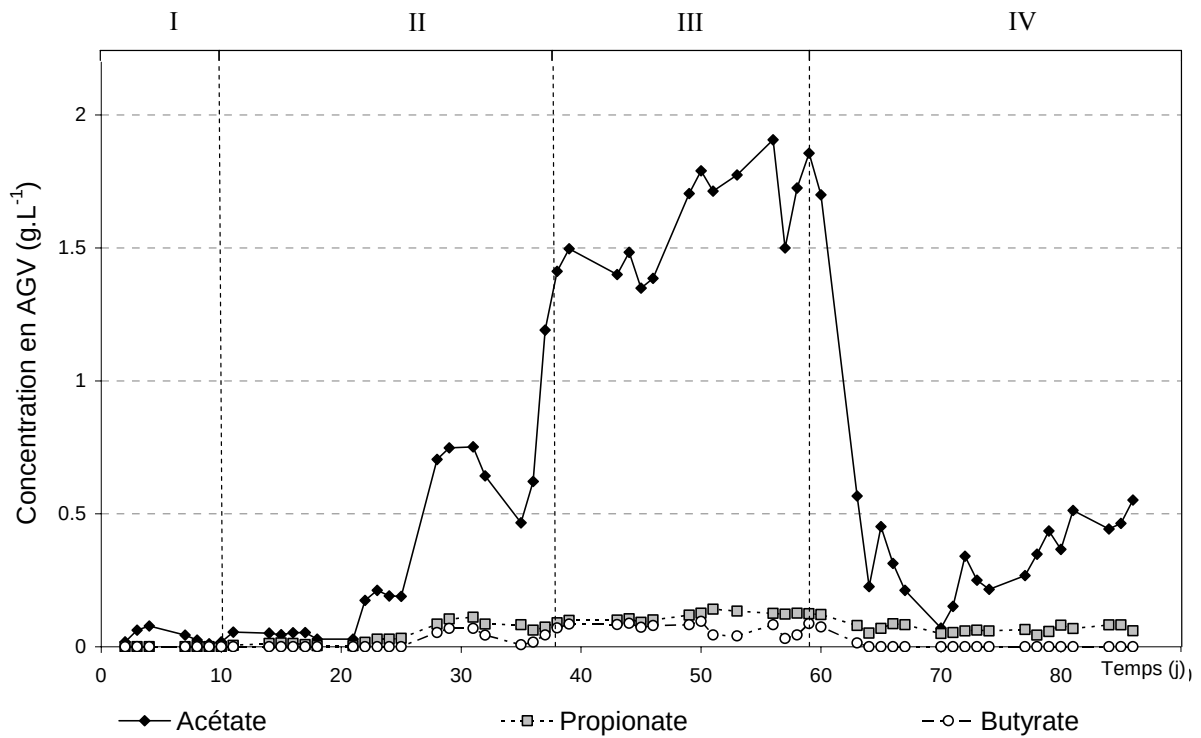


Figure III.28 : Stratégie A - évolution de la concentration en acétate, propionate et butyrate

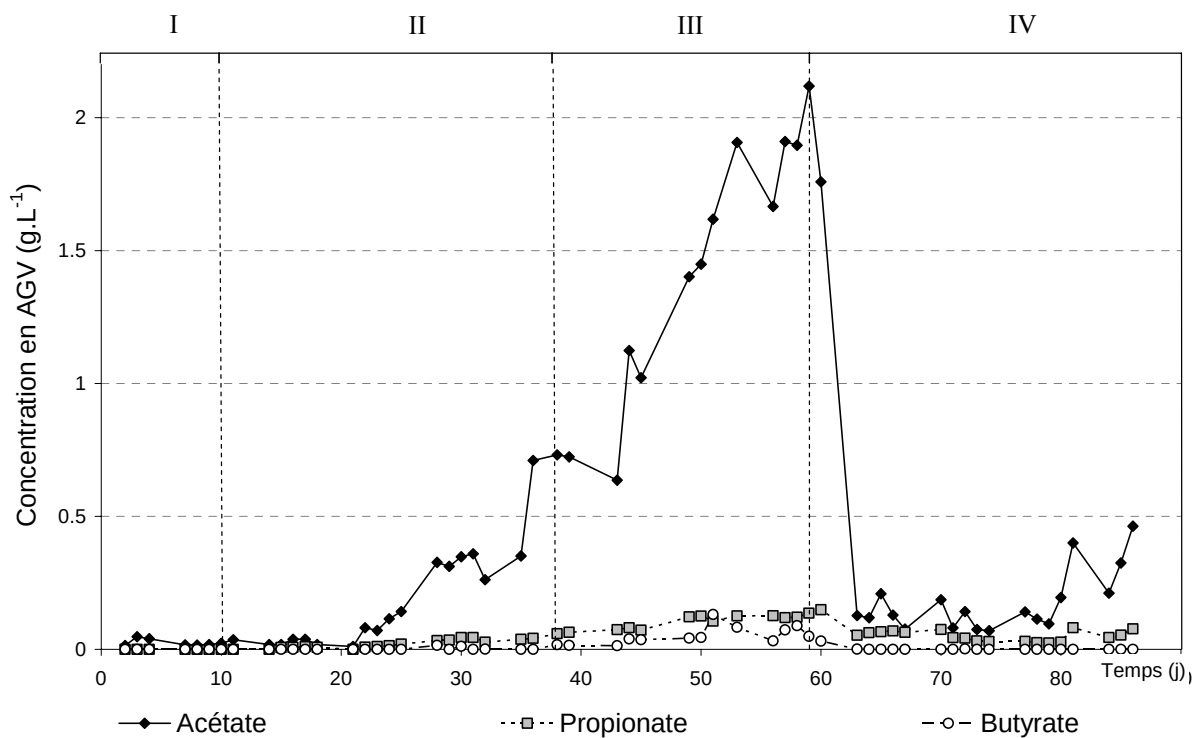


Figure III.29 : Stratégie B - évolution de la concentration en acétate, propionate et butyrate

Comme le montre la Figure III.20, bien qu'il soit soumis à une CVA plus élevée que le R_A , le R_B produit et accumule moins d'AGV. Par conséquent, durant cette période, le taux de

conversion de la DCO en méthane du R_B est plus élevé, il produit ainsi proportionnellement à la CVA, une quantité plus importante de biogaz que le R_A . Malgré cette augmentation substantielle de la production d'AGV qui témoigne d'une défaillance de la méthanogenèse, la quantité de biomasse produite augmente régulièrement. Le taux de détachement croît également régulièrement et atteint $80 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_A $115 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour R_B , mais il reste inférieur au taux d'accumulation qui atteint des valeurs 180 et $270 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ à la fin de cette phase, respectivement pour les réacteurs A et B. La part du carbone dédiée à la production de biomasse diminue par rapport à la première phase et ne représente plus que pour 9% du bilan massique durant cette seconde phase (Tableau III.2 et Tableau III.3).

III.3.3 Phase III : ralentissement de la croissance et carence en micronutriments

Cette étape est marquée par une chute globale du rendement épuratoire des deux réacteurs (Figure III.21). Après le 38^{ème} jour, les réacteurs ne parviennent pas à dégrader le surplus de DCO imposé lors de l'augmentation de la CVA. Durant toute cette période, comme on peut le constater en observant les Figure III.20, Figure III.28 et Figure III.29, la production d'AGV augmente fortement. Le 59^{ème} jour les concentrations atteignent des valeurs supérieures à 1,8 et $2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les réacteurs A et B, respectivement. Cette forte production d'AGV se fait au détriment de la production de méthane qui est divisée par trois à la fin de cette phase.

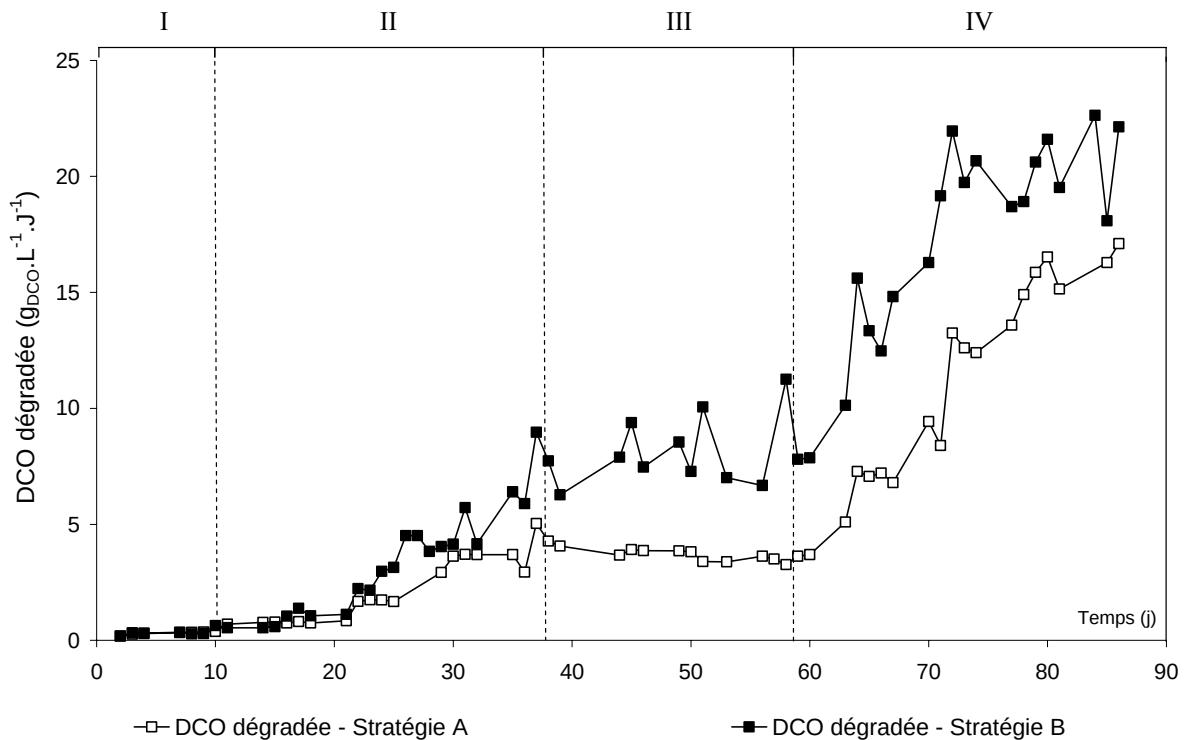


Figure III.30 : Variation de la DCO dégradée par le R_A et la R_B durant la période de montée en charge

Cette accumulation d'AGV combinée à une baisse du rendement de conversion de la DCO en méthane et à la stagnation de la valeur de DCO dégradée semble indiquer que cette faillite de la méthanogenèse est causée par une limitation nutritionnelle. Les éléments traces métalliques tels que le cobalt ou le nickel jouent un rôle crucial en tant que composants de groupement prosthétiques impliqués dans les processus métaboliques de la méthanogenèse (Thauer 1998). Le cobalt est ainsi présent dans les corrinoïdes impliqués dans les activités méthyle-transférase et carbonemonoxyde (CO) deshydrogénases. Le nickel est un composant du méthyle coenzyme M, des facteurs F420 et F430, des hydrogénases et des deshydrogénases (Florencio *et al.* 1993; Gonzalez-Gil *et al.* 1999; Paulo *et al.* 2004) (Thauer 1998).

Le déficit en ces deux éléments est identifié par de nombreux auteurs comme étant à l'origine d'une dégradation incomplète des composés organiques lors du processus de méthanisation, ce blocage aboutissant à l'accumulation de composés intermédiaires tels que les AGV (Percheron *et al.* 1997; Patidar *et al.* 2004). Comme le démontrent les analyses ICP-AES réalisées sur l'alimentation des réacteurs (Tableau II.4), ces éléments traces sont soit absents, soit retrouvés à de très faibles concentrations dans l'effluent utilisé. Ces résultats sont conformes aux données concernant la composition du vin recueillies dans la littérature (Pandiyan *et al.* 1999; Marengo *et al.* 2003; Lara *et al.* 2005).

Concernant le R_A , la quantité de DCO dégradée, dont l'évolution est représentée par la Figure III.30, décroît de 4,7 à 3,8 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ alors que le rendement épuratoire diminue fortement jusqu'à des valeurs inférieures à 60%. En conséquence, selon la stratégie A, la CVA est stabilisée à 6,5 $\text{g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

Dans le cas de la stratégie B, comme le montre la Figure III.31, l'interprétation des variations du débit de biogaz selon les paramètres fixés n'a pas permis de détecter l'état de carence et la dérive du système vers acidogenèse. Durant cette phase de carence, la majorité des variations de débit de gaz se sont révélées non interprétables. La Figure III.31 propose un exemple de variation du débit de biogaz enregistré lors d'une impulsion réalisée le 45^{ème} jour. Comme on peut l'observer, à CVA constante, le débit de biogaz est en augmentation perpétuelle. Ainsi, sept des neuf impulsions sur la CVA réalisées durant cette phase n'ont pu être exploitées puisque le retour aux valeurs de débit mesuré avant l'impulsion du débit ne s'est pas produit et le calcul du $V_{\text{mesuré}}$ a été impossible. Durant cette phase de carence, seules deux impulsions du débit d'alimentation ont pu être interprétées favorablement et ont donné lieu à une augmentation de la CVA (le 43^{ème} et le 57^{ème} jour). La CVA du R_B a ainsi été augmentée de

6,5 à 10,7 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ en 20 jours, malgré la forte tendance du système à dériver vers acidogénèse. Le rendement épuratoire chute toutefois de manière moins importante dans le cas de la stratégie A et se maintient à des valeurs supérieures à 70%, et la DCO dégradée augmente légèrement, passant de 6,3 à 7,8 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. De plus, le R_B , même soumis à une CVA plus élevée, produit proportionnellement 47 à 65% d'AGV en moins.

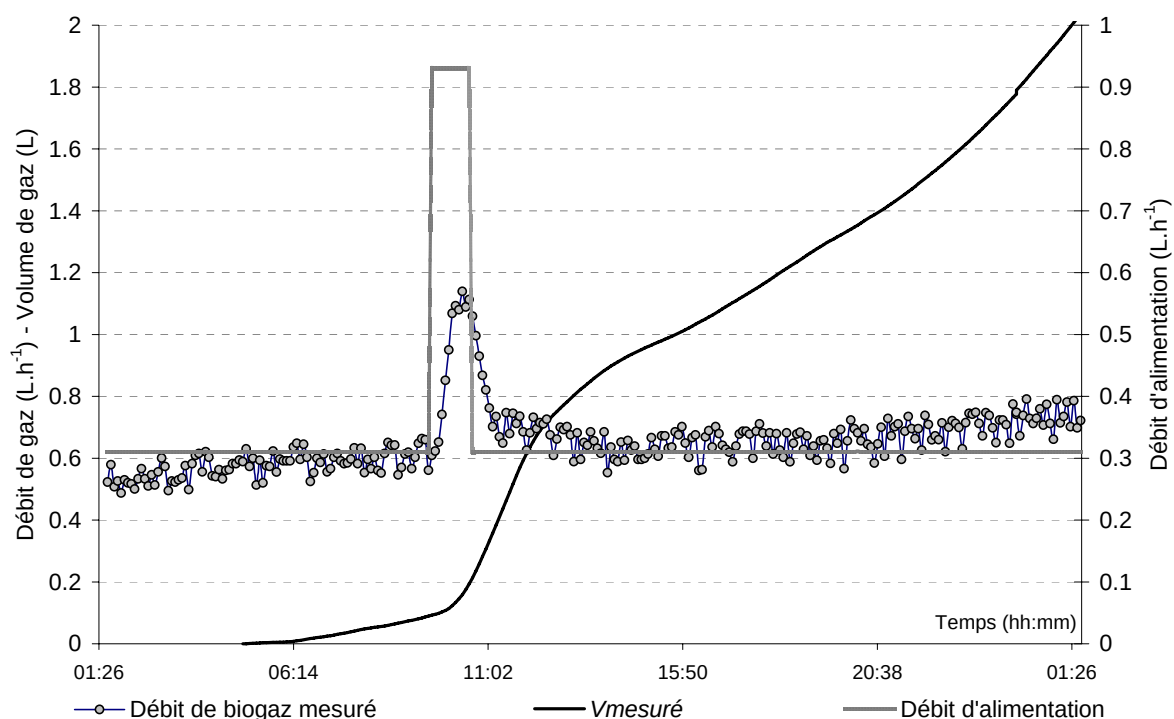


Figure III.31 : Variation du débit d'alimentation, du débit de biogaz et de $V_{\text{mesuré}}$ lors d'une impulsion de CVA réalisée le 45^{ème} jour

D'un point de vue général, chacune des deux stratégies est basée sur des paramètres de contrôles constants (le ratio $\text{DCO}_{\text{sortant}} / \text{DCO}_{\text{entrant}}$ pour la stratégie A, et le ratio débit d'alimentation/débit de biogaz pour la stratégie B)). Si l'utilisation de paramètres constants permet une application simplifiée de telles stratégies de contrôle de la montée en charge pour les procédés de digestion anaérobie, elle ne permet pas une adaptation optimale de ces stratégies en cas de faillites du système telle que la limitation en micronutriments.

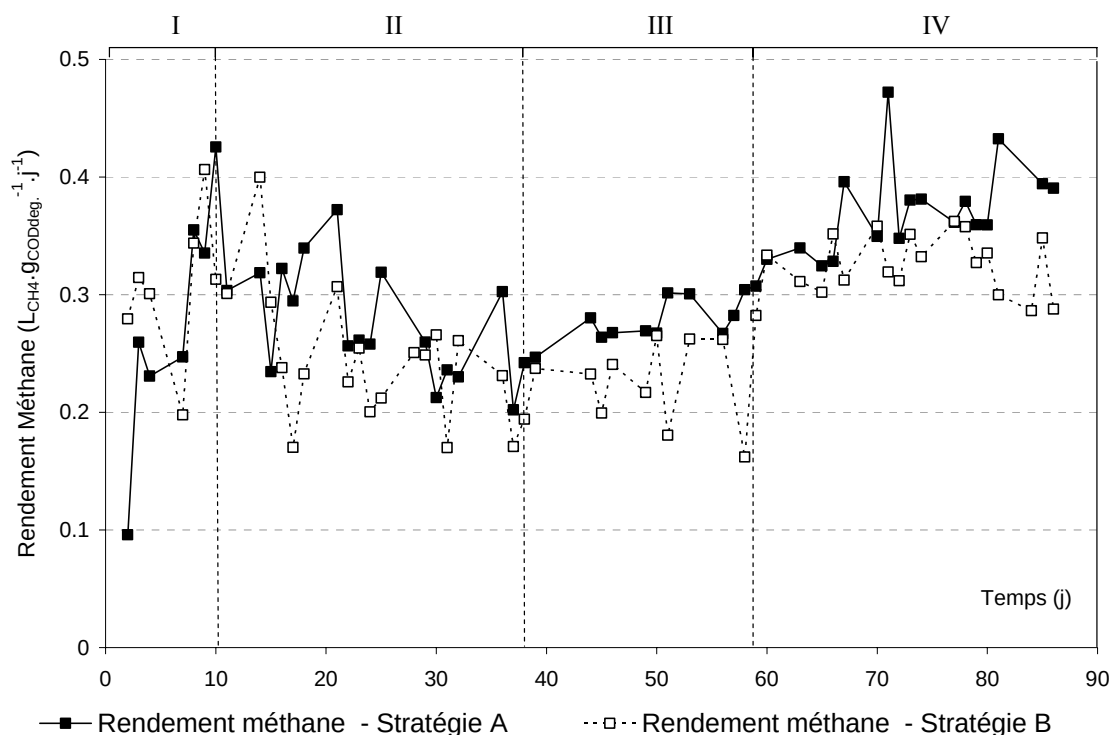


Figure III.32 : Evolution du rendement méthane pour les deux réacteurs

L'activité du consortium méthanogène est fortement dépendante de facteurs environnementaux tels que la biodisponibilité en micronutriments (Goodwin *et al.* 1990; Osuna *et al.* 2003; Zandvoort *et al.* 2003). L'impact négatif de la carence en nutriment sur l'activité du biofilm peut être observé à la Figure III.27. Toutefois, durant cette phase de carence, les valeurs d'activité spécifique du biofilm mesurées (de 0,7 à 3 $g_{DCOdeg.} \cdot g_{MVA}^{-1} \cdot j^{-1}$) restent élevées en comparaison des activités classiquement mesurées pour les procédés intensifs à biomasse fixée (UASB, EGSB, biofiltres) (Alves *et al.* 1998), et également plus élevées que les activités spécifiques relevées pour des procédés équivalents de types lit fluidisé ou turbulé (Michaud *et al.* 2002; Garcia-Morales *et al.* 2003). Ceci est dû, comme cela a été montré précédemment, aux fortes contraintes hydrodynamiques à l'origine du développement d'un biofilm fin et actif.

Le manque de micronutriments responsable de la chute des performances épuratoires a également un impact négatif sur la croissance du biofilm. Comme le montre la mesure des MVA, représentée par la Figure III.22, la production de biomasse est inhibée et la croissance du biofilm ralentie. Au 59^{ème} jour, la concentration en MVA est égale à 4 $g \cdot L^{-1}$ pour le R_A et 5,4 $g \cdot L^{-1}$ pour le R_B , alors que la quantité de biomasse détachée stagne à des valeurs comprises 0,6 et 1,6 $g \cdot L^{-1}$. La part du carbone entrant dédiée à la production de biomasse diminue encore et ne représente plus que 5% du bilan massique. Le taux d'accumulation décroît d'un facteur

trois pour atteindre $63 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour les deux réacteurs à la fin de la phase de carence. Dans ce type de réacteurs triphasiques la structure du biofilm est principalement modelée par des contraintes physiques et mécaniques. Le détachement est dû aux chocs entre les particules de support qui sont à l'origine des phénomènes d'attrition responsables de l'érosion des parties externes du biofilm ou des fragments adhérant de manière plus lâche. L'intensité du détachement est donc en partie fonction de paramètres fixes (vitesse de gaz ou du taux de remplissage solide) et identiques pour les deux réacteurs tout au long de l'étude. Ceci permet d'expliquer que malgré un ralentissement notable de la croissance du biofilm le taux de détachement continue d'augmenter régulièrement et dépasse le taux d'accumulation pour atteindre $127 \text{ mg}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_A et $222 \text{ mg}_{\text{MVS}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_B le 53^{ème} jour.

III.3.4 Phase IV : complémentation en éléments traces métalliques, montée en charge et croissance du biofilm en conditions non limitantes

Afin de compléter le milieu carencé en micronutriments, une solution enrichie en éléments traces métalliques est ajoutée dans l'alimentation, à partir du 58^{ème} jour et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Comme le montre la Figure III.21, après cinq jours de complémentation, le rendement épuratoire atteint de nouveau des valeurs supérieures à 95% qui sont maintenues jusqu'à la fin de l'étude. En conséquence, durant cette dernière phase, la CVA peut être augmentée selon les stratégies appliquées jusqu'à $20,7$ et $23,2 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ respectivement pour les réacteurs A et B. La stratégie B permet une montée en charge plus rapide. Pour le R_A , l'objectif en terme de performances épuratoires (*i.e.* un minimum de $16 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) est atteint en 26 jours contre 12 jours pour le R_B .

L'augmentation de la CVA de $10,5$ à $23,2 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ en 12 jours correspond à une vitesse moyenne de montée en charge de $1,05 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_B , alors que pour le R_A la CVA est augmentée de $6,5$ à $20,7 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ en 26 jours, ce qui correspond à une vitesse de montée en charge de $0,55 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ deux fois plus faible. En considérant la même période de 12 jours, (entre le 58^{ème} et le 70^{ème} jour), la stratégie A permet une montée en charge de $6,5$ à $11,9 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, soit une vitesse moyenne de montée en charge de $0,38 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

La concentration en AGV chute de $2,5$ à $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pour les deux réacteurs (Figure III.20) et, comme on peut l'observer sur les Figure III.18 et Figure III.19, plus de 80% du carbone est converti en biogaz. Durant ces 28 derniers jours, après complémentation en micronutriments, l'activité spécifique du biofilm augmente pour atteindre des valeurs de $1,2 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour R_A et $1,7 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour R_B . Le rendement de conversion de la

DCO en méthane augmente également de $0,15 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCOdeg.}}^{-1}$ jusqu'à des valeurs proches du maximum théorique (*i.e.* $0,375 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCOdeg.}}^{-1}$). La production de biomasse croît de manière très significative pour les deux réacteurs. Les taux d'accumulation atteignent des valeurs très élevées de $520 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ pour le R_A et de plus du double pour le R_B , soit $1100 \text{ mg}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Les taux de détachement continuent également à croître plus lentement que les taux d'accumulation. Par conséquent, la biomasse produite reste principalement sous forme attachée et en 21 jours, la concentration de MVA passe de 4 à $9,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pour le R_A et de 5 à $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pour le R_B . Cette production de biomasse représente globalement 7 à 8% du carbone entrant.

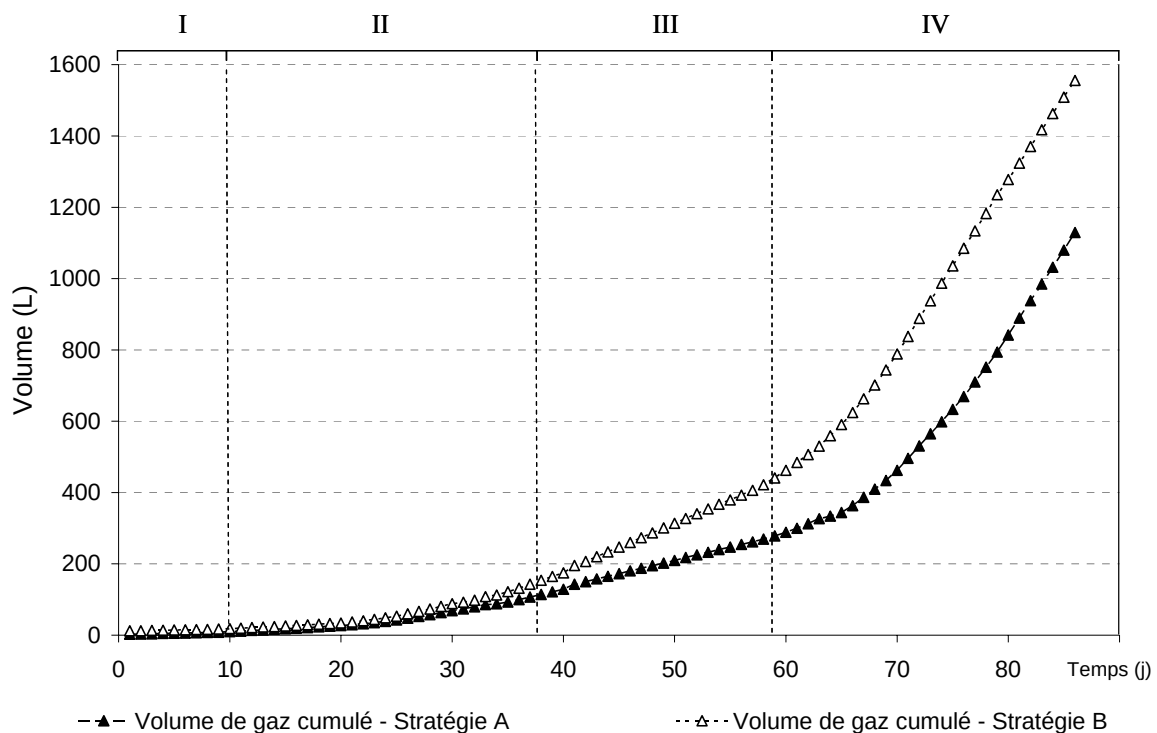


Figure III.33 : Stratégies A et B - volume de biogaz produit

III.3.5 Conclusions

Cette étude met en évidence l'importance cruciale de la composition du milieu en éléments traces métalliques dans le processus de méthanogenèse et en particulier le cobalt et le nickel. Si la carence ne paraît pas limitante lors des premières phases du démarrage, ni sur le plan des performances épuratoires, ni sur la croissance du biofilm et de la colonisation du support, en absence d'une quantité suffisante d'éléments traces métalliques, les performances épuratoires semblent limitées à des valeurs de charges volumiques traitées maximales de l'ordre de 5 à $6 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Toute augmentation de la CVA au-delà de ces valeurs a pour conséquence une accumulation d'AGV. Ce déficit en éléments traces métalliques a également

un impact négatif sur la croissance et sur l'activité spécifique du biofilm. Ces limitations peuvent être surmontées grâce à la complémentation adaptée du milieu en éléments traces métalliques. Elle permet de restaurer rapidement (en quelques jours) et durablement une activité méthanogène optimale et non limitante ainsi que la croissance du biofilm.

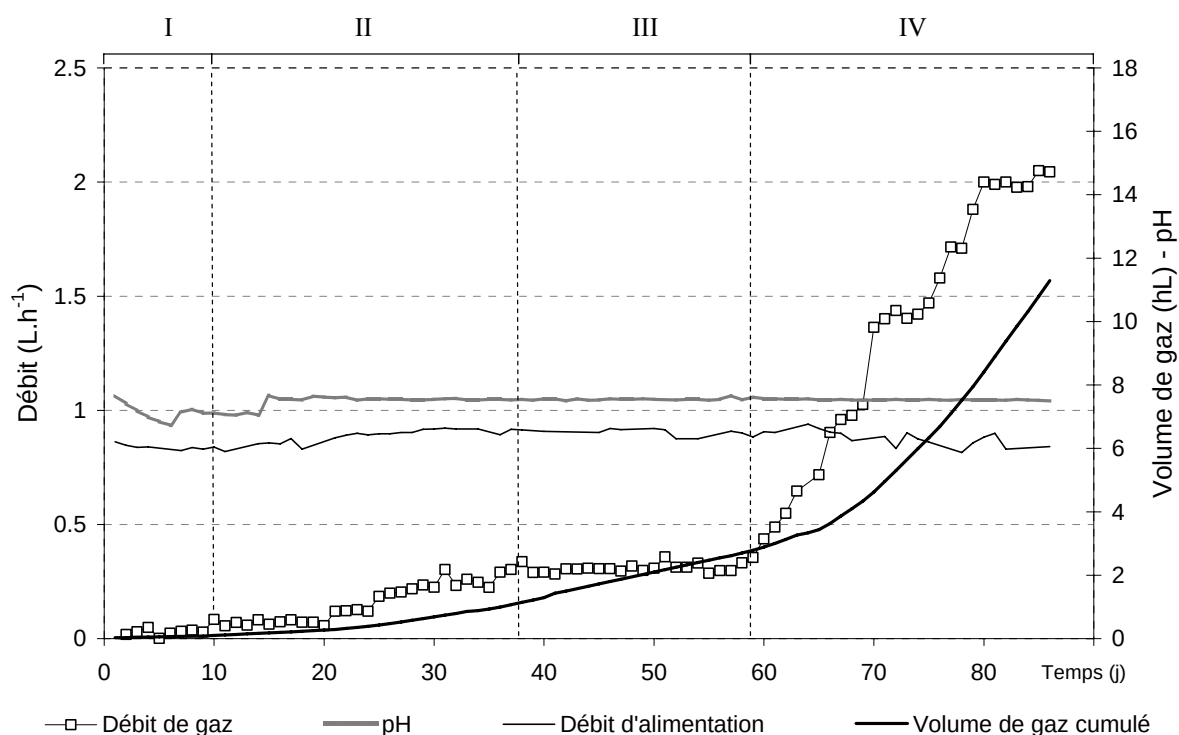


Figure III.34 : Stratégie A - Mesure des débits de gaz et d'alimentation, du pH et du volume de gaz cumulé

Concernant la comparaison des stratégies de démarrage, le calcul du bilan massique global sur toute la durée de l'étude reportée dans les Tableau III.2 et Tableau III.3 démontre un léger avantage de la stratégie B en terme de performance épuratoire. Après 86 jours de montée en charge, la quantité totale de DCO dégradée par le R_B est 30% plus élevée et la quantité de biogaz produit 32% plus importante (Figure III.33). De plus le réacteur soumis à la stratégie B produit et accumule moins d'AGV que le réacteur soumis à la stratégie A. Sur toute la durée de l'étude, le R_A convertit 19% du carbone entrant en AGV contre 11% pour le R_B. Enfin, l'objectif épuratoire (*i.e.* la dégradation de 16 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹) est atteint en 72 jours grâce à la stratégie B contre 81 jours pour la stratégie A. Ces durées auraient toutefois pu être raccourcies si l'alimentation avait été complétement dès le début. En dehors des périodes de déficit en éléments traces, durant lesquelles la différence entre les deux stratégies est masquée par la carence nutritionnelle, la stratégie de la charge maximale permet une montée en charge

plus rapide que la stratégie de l'épuration maximale ainsi que le développement plus rapide d'un biofilm actif.

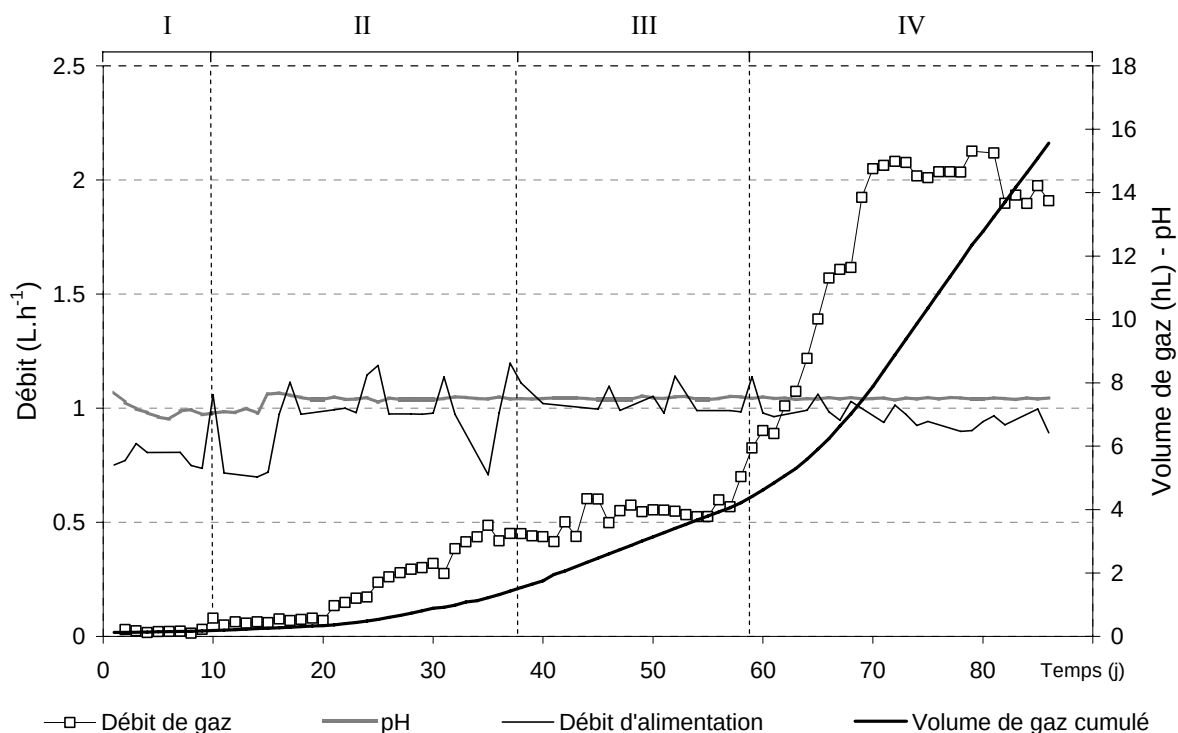


Figure III.35 : Stratégie B - Mesure des débits de gaz et d'alimentation, du pH et du volume de gaz cumulé

Bien que la stratégie B présente des avantages certains, elle démontre ses limites à plusieurs égards :

- Elle se révèle inapplicable lors de la phase initiale du démarrage, en raison des très faibles débits de biogaz produits. Cette limitation peut cependant être contournée par l'utilisation d'un débitmètre adapté à la mesure de faibles débits. D'un point de vue pratique, un tel capteur ne pourra toutefois être utilisé pour des débits plus élevés. Il est alors nécessaire d'utiliser plusieurs débitmètres afin de couvrir toute la gamme de mesure.
- Contrairement à la stratégie A, la stratégie B ne permet pas de détecter la faillite de la méthanogenèse due à la carence en cobalt et en nickel. Durant cette période, son application stricte a induit une augmentation de la CVA malgré l'accumulation d'AGV et la stagnation des valeurs de DCO dégradées. Sans l'apport d'un complément en éléments traces métalliques, cette augmentation aurait vraisemblablement entraîné une dérive du réacteur vers acidogenèse et un arrêt complet et probablement irréversible de la méthanisation.

Ainsi, bien que la stratégie B ait montré ses limites en cas de carence en éléments traces, cette étude démontre la possibilité de contrôler la phase de démarrage et de montée en charge des LTI anaérobies grâce à une stratégie basée uniquement sur la mesure du débit de production de biogaz. L'utilisation de capteurs simples et peu coûteux pour évaluer les capacités épuratoires du milieu rend cette stratégie réalisable d'un point de vue économique.

III.4 Etude moléculaire des écosystèmes lors de la phase de démarrage des LTI selon les stratégies A et B.

L'objectif de cette étude est d'établir un lien entre les performances évaluées lors du démarrage des réacteurs A et B selon les stratégies de l'épuration maximale et de la charge maximale (présentées au chapitre précédent), et la microbiologie des écosystèmes correspondants appréhendée par PCR-SSCP (chapitre "Matériels et Méthodes").

Pour chaque réacteur, des prélèvements de support ont été réalisés les 1^{er}, 16^{ème}, 23^{ème}, 26^{ème}, 35^{ème}, 44^{ème}, 54^{ème}, 65^{ème}, et 72^{ème} jours de fonctionnement. Une amplification sélective de la région variable V3 de l'ADNr 16S, des bactéries et des *Archaea* a été effectuée par PCR. Les produits de PCR obtenus ont été séparés par électrophorèse SSCP à l'aide d'un analyseur génétique. Chaque échantillon de support colonisé est alors visualisé sous la forme d'un profil de pics où les pics correspondent aux différentes espèces composant le biofilm. Dans chaque profil SSCP, la surface relative d'un pic par rapport à la surface totale du profil reflète le niveau d'amplification de l'ADN des micro-organismes correspondants. L'alignement et la comparaison des différents profils révèlent les changements de population qui composent le biofilm. Quarante-deux profils ont été obtenus ; soit deux profils correspondant aux populations d'*Archaea* et de bactéries présentes dans l'inoculum, puis pour chaque réacteur, dix profils correspondant aux populations de bactéries (Figure III.37 et Figure III.38 respectivement pour les réacteurs A et B) et dix profils de populations d'*Archaea* (Figure III.39). Le suivi complet de l'évolution des populations d'*Archaea* et de bactéries au cours du temps, ainsi que l'identification des espèces majoritaires sont présentés dans cette étude.

III.4.1 Dynamique des populations

L'alimentation en continu des réacteurs a débuté après une phase d'inoculation d'une durée de douze heures, au cours de laquelle les deux réacteurs ont fonctionné en mode discontinu avec recirculation de l'inoculum. Les premiers prélèvements de support analysés (jour 1) ont été réalisés vingt-quatre heures après le début de l'alimentation en continu des réacteurs. La comparaison de leurs profils SSCP avec celui de l'inoculum montre un attachement et un développement rapide et préférentiel d'un nombre limité d'espèces bactériennes (Figure III.36). Cette observation confirme la fixation précoce des microorganismes observée lors de l'étude menée précédemment sur les premières phases de colonisation bactériennes du support (chapitre 0). Toutefois, alors que l'inoculum produit un

profil complexe caractéristique d'une communauté microbienne très diversifiée (Zumstein *et al.* 2000), les supports des deux réacteurs présentent des profils très simplifiés, et presque identiques, où dominant fortement deux pics (E et K sur la Figure III.36). Ces deux pics co-migrent avec des pics présents, mais non majoritaires, sur le profil de l'inoculum.

Ces résultats sont différents de ceux observés lors de l'étude préliminaire menée sur les premières phases de colonisation bactériennes du support. En effet, dans cette étude, les profils correspondant à l'inoculum et ceux obtenus à partir des échantillons de support prélevés douze heures après l'inoculation étaient superposables. Nous supposons que le réacteur fonctionnant en mode discontinu, sans apport d'effluent, la sélection des microorganismes fixés était due principalement aux conditions physico-chimiques (nature du support) et aux contraintes physiques (conditions du mélange et forces de détachement) régnant dans le réacteur au moment de l'inoculation. Le réacteur n'étant pas alimenté, aucune croissance n'a changé la répartition des différentes populations présentes.

Ici, la sélection des espèces qui vont croître sur le support s'opère rapidement, vraisemblablement en fonction de leur capacité à dégrader le substrat apporté dans le réacteur. Si la majorité des microorganismes a pu se fixer lors du contact initial entre le support et l'inoculum, seules les bactéries adaptées à leur nouveau substrat ont pu croître et se retrouvent ainsi largement majoritaires vingt-quatre heures après le début de la phase d'alimentation en continu.

L'évolution des populations bactériennes pendant la montée en charge des réacteurs A et B est présentée sur les Figure III.37 et Figure III.38. Pour faciliter la comparaison des profils entre eux, les pics sont représentés sous la forme de ronds de diamètres différents suivant l'importance relative du pic dans l'ensemble du profil. Chaque ligne correspond à un profil pour lequel les distances séparant les pics ont été standardisées pour faciliter la lecture. Chaque colonne présente la dominance d'un pic dans le profil au cours du temps.

Globalement on constate que les espèces dominantes changent beaucoup entre le 1^{er} et le 16^{ème} jour de fonctionnement des réacteurs et restent ensuite relativement stables jusqu'à la fin de l'expérience. Les pics dominants E et K sont progressivement remplacés par les pics F et J pour le réacteur A et par les pics G, H et J pour le réacteur B. Cette variation importante des populations bactériennes peut être due à la sélection imposée par le substrat et les conditions de croissance dans le réacteur. Les microorganismes fixés au jour 1 seraient les microorganismes de l'inoculum les mieux adaptés au substrat à dégrader. Ils seraient ensuite rapidement remplacés par d'autres, mieux adaptés aux conditions de croissance dans les réacteurs en fonctionnement.

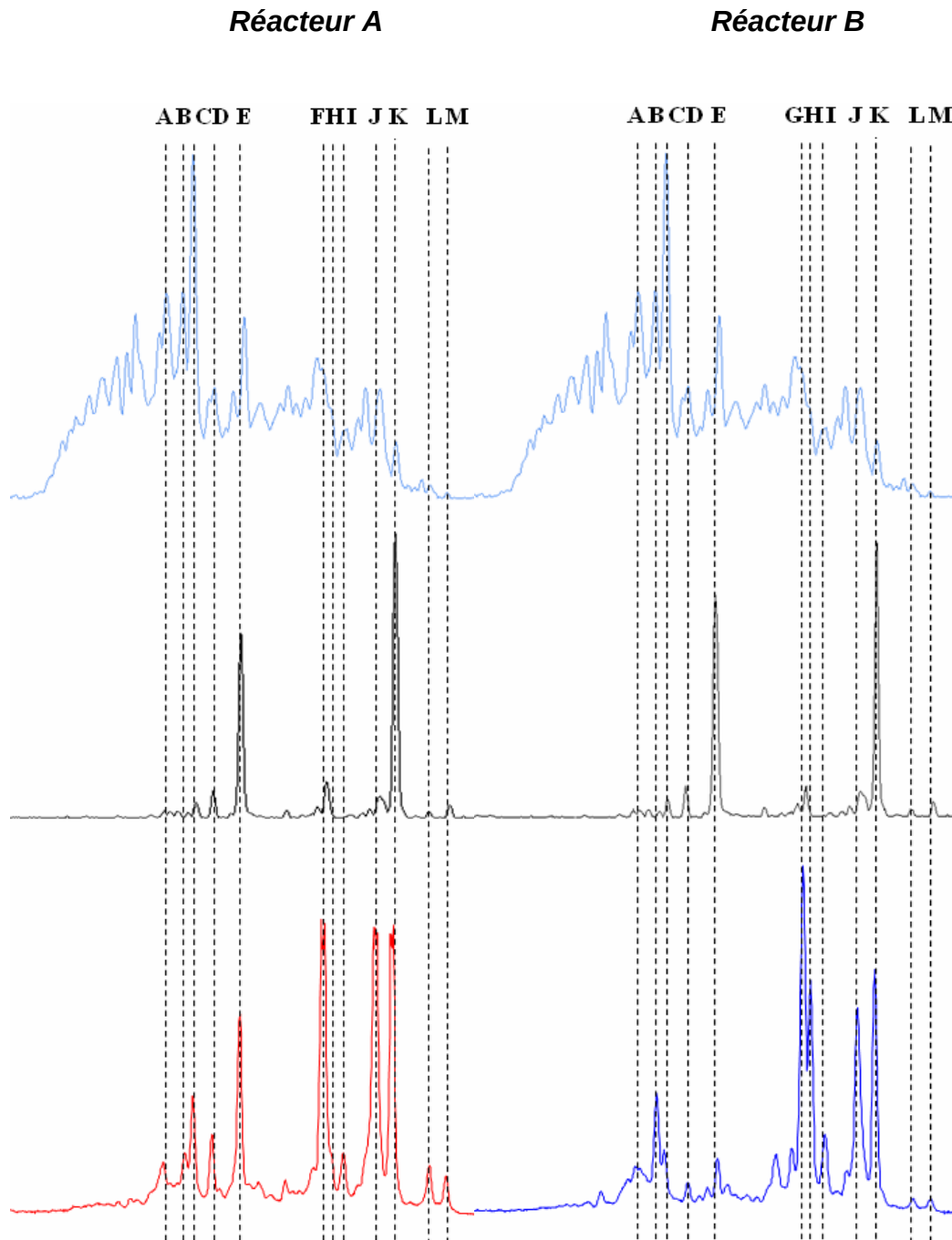


Figure III.36 : Alignement des profils SSCP des populations bactériennes de l'inoculum (en haut), du biofilm 24 heures après l'inoculation (au centre), et du biofilm le 16^{ème} jour pour le R_A et le 23^{ème} jour pour le R_B (en bas).

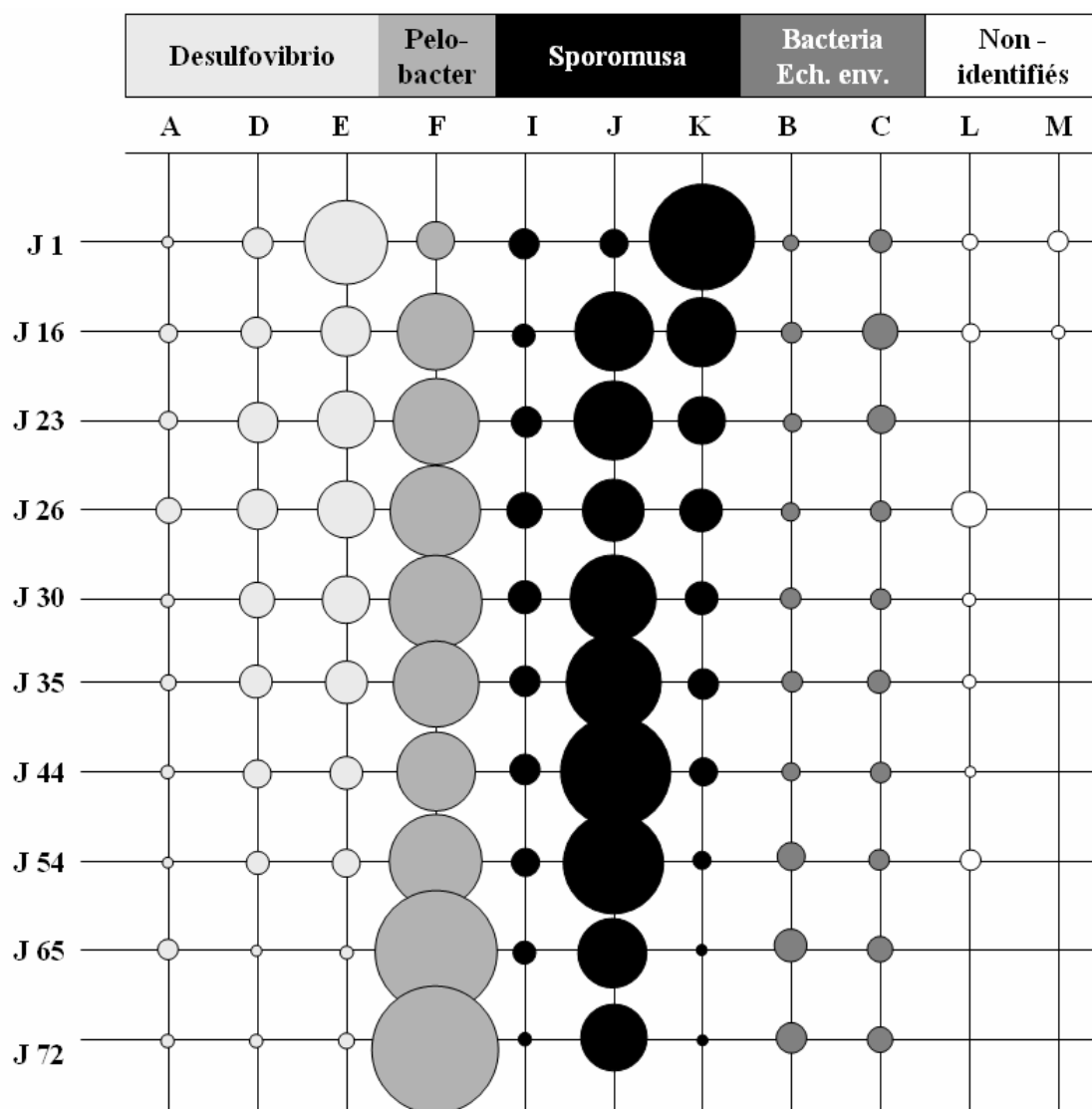


Figure III.37 : Réacteur A - Représentation simplifiée des profils SSCP - Evolution des populations bactériennes du 1^{er} au 72^{ème} jour. Les pics A à M correspondent aux pics de la Figure III.36. Leur identité est présentée dans l'encart au-dessus du graphe.

L'identification des pics observés sur les profils SSCP a été effectuée selon les protocoles détaillés au chapitre matériels et méthodes. Deux banques de clones ont été réalisées à partir des échantillons de support prélevés le 16^{ème} jour pour le réacteur soumis à la stratégie A et le 23^{ème} jour pour le réacteur soumis à la stratégie B. Ces échantillons ont été sélectionnés en fonction de la représentativité de leurs profils SSCP en termes de nombre et de taille de pics.

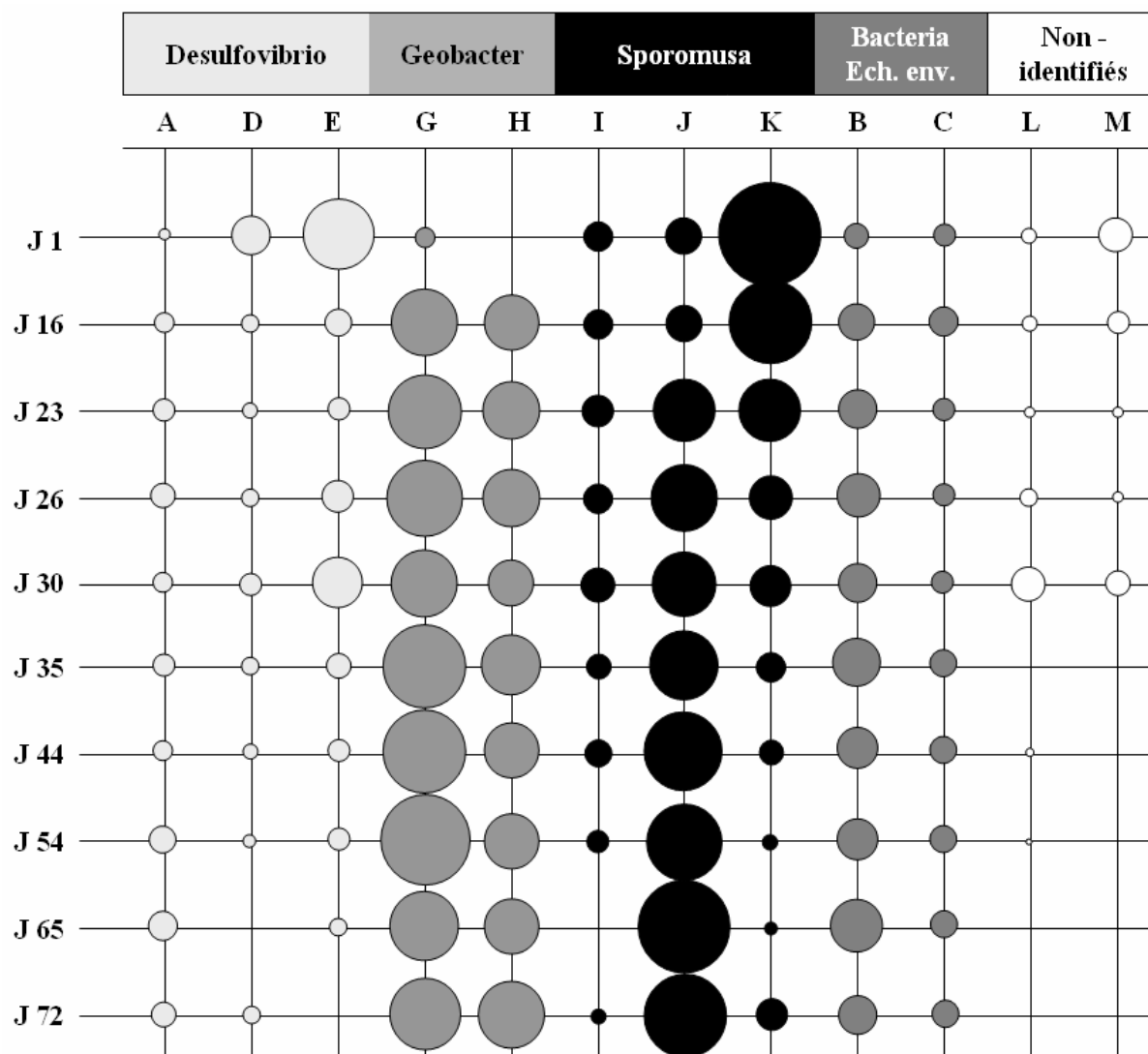


Figure III.38 : Réacteur B - Représentation simplifiée des profils SSCP - Evolution des populations de bactéries du 1^{er} au 72^{ème} jour

L'assignation des pics a été effectuée par criblage, par PCR sur colonie, des ADN_r 16S clonés et électrophorèse SSCP des inserts. Les clones présentant un pic qui co-migrerait avec un des pics du profil total de l'échantillon ont été retenus.

Le criblage de 50 clones a permis d'assigner les principaux pics des profils bactériens de chacun des échantillons (Figure III.36 pics A à M). Au moins deux clones indépendants ont été séquencés pour chaque pic assigné. Les séquences obtenues, d'environ 200pb, ont été comparées aux séquences disponibles dans les bases de données en utilisant le programme BLAST du National Center for Biotechnology Information. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.4.

Tableau III.4 : Affiliation phylogénétique des séquences d'ADNr 16S clonées

Pic	Nombre de clones	Groupe phylogénétique	Pourcentage de similarité	Espèce ou clone le plus proche	Données environnementales
A	2 (R _B)	<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfovibrio</i>	99	<i>Desulfovibrio</i> sp. A2	Bactérie sulfato-réductrice Effluent de fonderie de zinc
B	2 (R _A)	<i>Firmicutes Clostridia</i>	98	Clone de bactérie non cultivée MKEW-104	Compartiment intestinal de larve de <i>Melolontha melolontha</i> (Coleoptera: Scarabaeidae)
C	2 (R _A) 1 (R _B)	<i>Green non sulphur</i> <i>Chloroflexi</i>	99	Clone SJA - 117	Consortium microbien transformant le trichlorobenzène
D	2 (R _A) 1 (R _B)	<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfovibrio</i>	99	<i>Desulfovibrio</i> sp. A2	Bactérie sulfato-réductrice Effluent de fonderie de zinc
E	4 (R _A)	<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Desulfovibrio</i>	98	<i>Desulfovibrio</i> sp. Bsl2	Bactérie sulfato-réductrice Effluent de fonderie de zinc
F	2 (R _A)	<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Pelobacter</i>	99	<i>Pelobacter</i> sp. clone M113	Réacteur UASB anaérobie
G	4 (R _A)	<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Geobacteraceae</i>	100	Bactérie anaérobie syntrophe NE23-3	Bactérie oxydant l'éthanol Boues d'un digesteur anaérobie
H	3 (R _A) 3 (R _B)	<i>Deltaproteobacteria</i> <i>Geobacteraceae</i>	99.5	Clone SJA-152	Consortium microbien transformant le trichlorobenzène
I	1 (R _A) 2 (R _B)	<i>Clostridia</i> <i>Sporomusa</i>	97	Clone AA01	Digesteur anaérobie alimenté par du glucose
J	3 (R _A) 3 (R _B)	<i>Firmicutes</i> <i>Sporomusa</i>	94	<i>Sporomusa</i> sp. DR6	Echantillon de sol anoxique inondé pour la culture du riz
K	4 (R _A) 4 (R _B)	<i>Firmicutes</i> <i>Sporomusa</i>	95	<i>Sporomusa ovata</i>	Bactérie anaérobie sporulante fermentant les sucres et les alcools
N	2 (R _A - R _B)	<i>Euryarchaeota</i> <i>Methanosarcinaceae</i>	97	<i>Methanosarcinaceae</i> non cultivée clone LrhA78	Rhizosphère du riz
O	2 (R _A - R _B)	<i>Euryarchaeota</i> <i>Methanobacterium</i>	99.5	<i>Methanobacterium beijingense</i>	Digesteur anaérobie

Six des onze espèces identifiées présentent une similarité supérieure à 97% avec des espèces ou des clones environnementaux affiliés au groupe des *Delta Proteobacteria* et appartiennent aux genres *Geobacter*, *Pelobacter* ou *Desulfovibrio*. Quatre appartiennent au groupe des *Firmicutes*, dont trois au genre *Sporomusa*. Enfin, un pic appartient au groupe des *Chloroflexi* et deux pics (L et M) n'ont pas pu être identifiés.

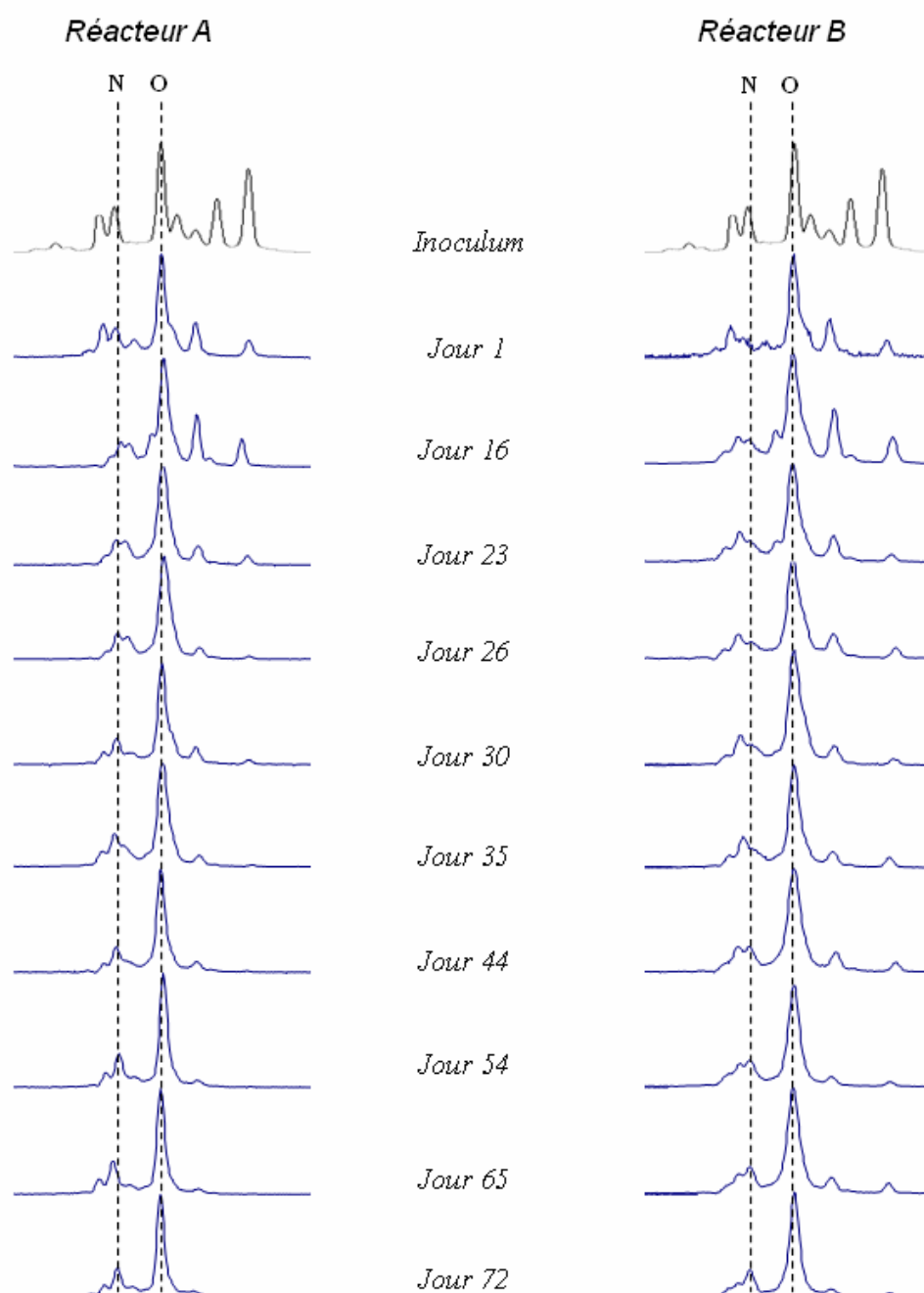


Figure III.39 : Alignement des profils SSCP des populations *Archaea* de l'inoculum et du biofilm des réacteurs du 1^{er} au 72^{ème} jour de la phase de démarrage.

Les profils SSCP *Archaea* obtenus à partir de l'inoculum montrent une diversité faible avec seulement sept pics visibles. Ceux obtenus pour les échantillons de support prélevés le 1^{er} jour sur les deux réacteurs sont très similaires. Ils sont constitués de six pics majoritaires, dont cinq co-migrent avec des pics présents sur les profils de l'inoculum (Figure III.39). Contrairement aux bactéries, la diversité des *Archaea* est faible et tend à diminuer tout au long du démarrage des réacteurs. Au 72^{ème} jour, les profils des deux réacteurs ne sont plus constitués que de deux pics dont un est largement majoritaire. La banque de clones permettant l'identification des pics a été réalisée à partir d'un échantillon de support prélevé le 54^{ème} jour. Le criblage mené par PCR-SSCP sur vingt clones a montré que les fragments clonés appartenaient seulement à deux espèces. Le pic dominant O a été identifié comme une *Archaea* méthanogène acétoclaste du genre *Methanosaeta*, tandis que le pic N représente une *Archaea* méthanogène hydrogénotrophe du genre *Methanobacterium* (Figure III.39). Les deux types d'*Archaea* méthanogènes classiquement trouvés dans les écosystèmes de digestion anaérobie (Leclerc *et al.* 2001; Dabert *et al.* 2002) sont donc présents dans les deux réacteurs. Cependant, le type acétoclaste est majoritairement représenté comparé au type hydrogénotrophe.

III.4.2 Dégradation de l'éthanol

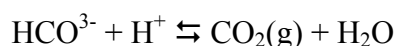
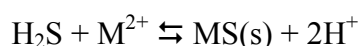
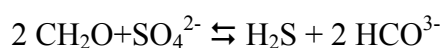
La dégradation complète de l'éthanol en méthane et dioxyde de carbone requiert l'activité combinée de plusieurs groupes de microorganismes impliqués à différents niveaux de la chaîne trophique de la digestion anaérobie. Leur identification et les connaissances actuelles de leurs voies métaboliques privilégiées permettent de proposer un schéma global de dégradation pour chacun des réacteurs (Tableau III.5 des voies métaboliques et (Figure III.40).

Considérant le genre *Sporomusa*, sept des huit espèces caractérisées à ce jour ont été isolées dans des habitats anaérobies (Kuhner *et al.* 1997). Ces bactéries sont capables de convertir en acétate de nombreux substrats tels que le pyruvate, le lactate, le glycérol, le méthanol, l'éthanol, le formate et le fructose, mais aussi le dioxyde de carbone et l'hydrogène. Dans la plupart des cas, et en particulier lorsque le donneur d'électrons est l'éthanol, le composé réduit final est l'acétate (Kuhner *et al.* 1997) (Biebl *et al.* 2000). Nous pouvons donc supposer qu'elles participent activement à la production d'acétate dans les deux réacteurs, favorisant ainsi la croissance des *Archaea* méthanogènes du groupe des *Methanosarcinaceae*.

En effet, toutes les *Archaea* méthanogènes oxydent l'hydrogène et réduisent le dioxyde de carbone selon les réactions décrites dans le Tableau III.5. Seuls les membres du groupe des *Methanosarcinaceae* sont également capables de métaboliser le méthanol, la méthylamine et l'acétate comme seuls donneurs d'électrons pour leur croissance et la production de méthane.

Les *Desulfovibrio* sont des bactéries sulfatoréductrices de type I qui utilisent le sulfate comme accepteur terminal d'électrons. De nombreuses espèces du genre ont la capacité de fonctionner soit comme consommatrices, soit comme productrices d'hydrogène. Dans un environnement riche en sulfate, elles utilisent des substrats simples tels que l'éthanol, le fumarate, le malate, le pyruvate comme source de carbone et d'énergie et les oxydent de manière incomplète en acétate et dioxyde de carbone en produisant du sulfure d'hydrogène (H_2S) (Widdel 1988). Elles peuvent alors consommer l'hydrogène produit par les bactéries fermentaires syntrophes et entrer en compétition avec les *Archaea* méthanogènes hydrogénotrophes (Widdel 1988). En absence ou en présence de très faibles concentrations en sulfate, elles peuvent produire de l'hydrogène en utilisant comme substrat le lactate ou l'éthanol (Tableau III.4). Une étude de Raskin *et al.* (Raskin *et al.* 1996) mentionne la persistance d'un nombre important de *Desulfovibrio* en absence de sulfate dans le biofilm d'un digesteur anaérobie à biomasse fixée.

Les membres du groupe des *Pelobacter* sont décrits soit comme des bactéries syntrophes oxydant l'éthanol, le propanol et le butanol en leurs acides correspondants grâce à un métabolisme fermentaire avec production d'hydrogène, soit comme des bactéries consommatrices d'hydrogène et d'éthanol pour produire de l'acétate ou du propionate avec réduction simultanée de sulfate. Les voies de formation du propionate à partir de l'éthanol ont été largement étudiées (Laanbroek *et al.* 1982; Schink *et al.* 1987; Tholozan *et al.* 1990) Chez *Pelobacter propionicus*, en présence de sulfate, l'éthanol est oxydé en acétate en utilisant le sulfate comme accepteur final d'électrons. En l'absence de sulfate et à pression partielle en hydrogène suffisante, l'éthanol est condensé avec du bicarbonate ou de l'acétate pour former du propionate ou du butyrate respectivement. A pression partielle en hydrogène faible, la réaction produit à la fois de l'acétate et du propionate (Bornstein *et al.* 1948; Braun *et al.* 1981; Eichler *et al.* 1984; Wu *et al.* 1996). L'oxydation de matière organique par l'activité des bactéries sulfato-réductrices s'accompagne généralement de la production de sulfure (H_2S), et de la précipitation des métaux sous la forme de sulfures métalliques :



CH_2O représente le donneur d'électrons et M^{2+} est l'ion métallique

Ce mécanisme, associé aux faibles concentrations en ions métalliques de l'influent, pourrait participer à la carence observée.

Tableau III.5 : Réactions potentiellement impliquées lors de la dégradation anaérobie de l'éthanol et valeurs de ΔG°

	ΔG° (kJ)
Acétogénèse syntrophe obligatoire (<i>Sporomusa</i>)	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$	+9.65
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$	+71.67
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$	+48.1
Homoacétogénèse	
$2 \text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-104.6
Fermentation propionique et butyrique de l'éthanol (Bactérie sulfato-réductrices en absence de sulfate)	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + 2/3\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons 1/3\text{CH}_3\text{COO}^- + 2/3 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} + 1/3\text{H}^+$	-41.5
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O}$	-66.83
En présence d'hydrogène	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-38.6
Oxydation sulfidogénique (bactéries sulfato-réductrices)	
Oxydation de l'acétate	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons 2 \text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
Oxydation de l'éthanol	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}^- + 1/2 \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + 1/2 \text{HS}^- + 1/2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-46.5
Oxydation du propionate	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3/4 \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + 3/4 \text{HS}^- + 1/4 \text{H}^+$	-37.7
Oxydation du butyrate	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + 1/2 \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons 2 \text{CH}_3\text{COO}^- + 1/2 \text{HS}^- + 1/2 \text{H}^+$	-27.8
Oxydation de l'hydrogène	
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	-152.1
Réduction dissimilatrice du sulfure	
$\text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{S}^0 \rightleftharpoons 2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2\text{S}$	-23.8
Réduction du fer ferrique	
$2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+$	-228.3
méthanogénèse hydrogénotrophe	
$\text{H}_2 + 1/4\text{CO}_2 \rightleftharpoons 1/4\text{CH}_4 + 1/2\text{H}_2\text{O}$	-32.68
méthanogénèse acétoclaste	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-35.83

Les valeurs de ΔG° sont calculées à partir des enthalpies de formation des composés données par Thauer *et al.* (Thauer *et al.* 1977)

La concentration en sulfate présente dans les procédés, ou plutôt le rapport DCO/sulfate, va donc influencer fortement le métabolisme de ces deux groupes microbiens (Percheron *et al.* 1996; Percheron *et al.* 1997). Dans notre étude, la concentration en sulfate

dans l'effluent augmente durant toute la durée de la montée en charge en fonction de la CVA. Elle varie de 0,75 en début d'expérience pour une CVA égale à $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ à $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pour une CVA égale à $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ en fin d'expérience. Toutefois, le rapport des concentrations reste constant (égal à 660) durant toute la durée de l'étude. Cette valeur élevée du rapport DCO/sulfate suggère que les bactéries du genre *Desulfovibrio* identifiées dans les deux réacteurs ont un métabolisme orienté vers la production d'hydrogène et n'entrent pas en compétition avec les *Archaea* méthanogènes (Hao *et al.* 1996). Au contraire, en carence de sulfate, elles pourraient être impliquées dans des transferts inter-spécifiques d'hydrogène avec les méthanogènes hydrogénotrophes (Ruel *et al.* 2002; Stams *et al.* 2005), ici les *Methanobacterium*.

De même, ce rapport DCO/sulfate élevé pourrait orienter le métabolisme du groupe *Pelobacter* vers la formation d'AGV, qui seraient alors utilisés par les autres groupes bactériens et par les *Archaea* acétoclastes.

Ainsi, le scénario le plus simple concernant le réacteur A serait le suivant. Dans les premiers jours après l'inoculation, les populations dominantes présentes sur le support sont les acétogènes *Sporomusa* et les sulfato-réductrices *Desulfovibrio* pour le domaine des bactéries et les *Methanosaeta* et *Methanobacterium* pour le domaine des *Archaea*. Ces quatre groupes microbiens seraient suffisants dans un premier temps pour dégrader l'éthanol en méthane via les voies conventionnelles acétotrophes et hydrogénotrophes de la digestion anaérobie. Toutefois, les *Archaea* sont probablement peu représentées car leur détection requière une PCR nichée et la production de méthane est indétectable au niveau des réacteurs. Après la mise en fonctionnement des réacteurs, les deux groupes bactériens dominants sont progressivement remplacés par des espèces présentant des fonctions équivalentes. Le *Desulfovibrio* serait remplacé par le *Pelobacter* tandis que l'espèce initiale de *Sporomusa* est échangée contre une autre du même genre. Les genres *Pelobacter* et *Sporomusa* deviennent alors dominants jusqu'au 72^{ème} jour. Le métabolisme fermentaire de ces deux genres étant orienté vers la production d'acétate de propionate ou de butyrate, la majorité des espèces bactériennes présentes concourent donc à la production d'acides gras volatils à courtes chaînes. Cette forte activité acétogène, associée à la diminution de l'activité des *Archaea* méthanogènes acétoclastes, a probablement participé à la forte accumulation d'acétate dans ce réacteur durant toute la première phase de l'étude (jusqu'au 59^{ème} jour). Cependant, durant la période de forte carence en éléments traces (profils du 30^{ème} au 54^{ème} jour), on constate un léger recul de l'abondance des *Pelobacter* au profit des *Sporomusa*. Cette relative diminution

de la proportion des sulfato-réductrices pourrait s'expliquer par la forte diminution de l'activité méthanogène hydrogénotrophe. La méthanogenèse inhibée, lors de la phase de carence, ne permettrait pas la consommation de l'hydrogène produit par la sulfato-réduction et sa pression partielle élevée inhiberait l'activité fermentaire des bactéries sulfato-réductrices. La reprise de l'activité méthanogène après la complémentation permettrait la consommation d'hydrogène dont la pression partielle, redevenue faible, n'inhiberait plus l'activité des sulfato-réductrices.

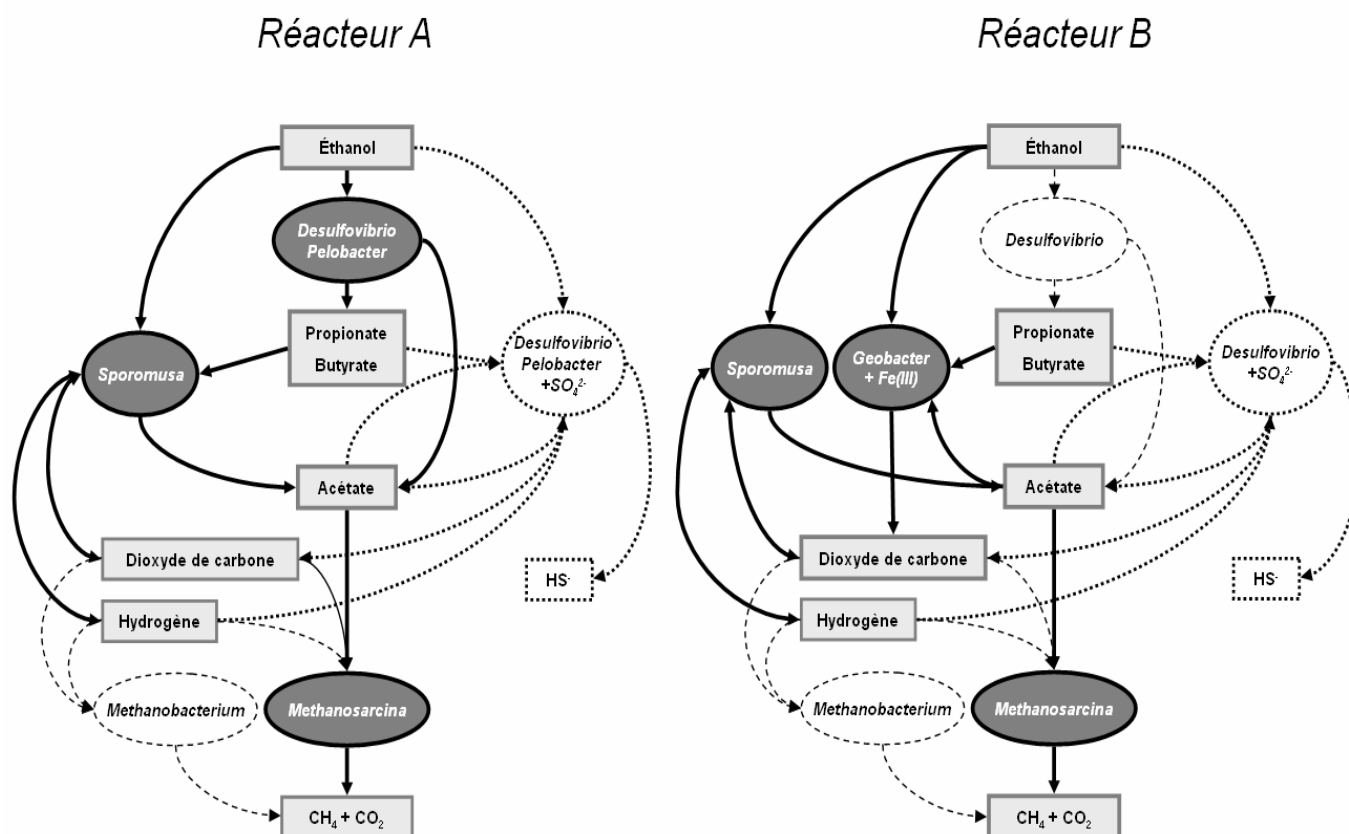


Figure III.40 : Proposition de représentation schématique des voies de dégradation de l'éthanol en méthane et dioxyde de carbone privilégiées pour chacun des réacteurs (en traits pleins et caractères gras sur la figure) et groupes de microorganismes impliqués. Les lignes en pointillés symbolisent les voies métaboliques de la sulfato-réduction et illustrent la compétition avec les microorganismes méthanogènes et acidogènes

Concernant le biofilm du réacteur B et son évolution, plusieurs différences peuvent être observées par rapport au réacteur A. La disparition apparente des *Desulfovibrio* est plus rapide, elle est accompagnée par l'installation d'espèces affiliées au groupe des *Geobacter* ; le genre *Pelobacter* n'apparaît pas dans les profils SSCP ; l'évolution des profils est globalement plus stable et plus régulière. Les bactéries fermentaires du genre *Geobacter* font partie d'un groupe monophylétique de *Delta-proteobacteria* comprenant les genres *Pelobacter*,

Desulfuraomusa et *Desulfuromonas*. Elles sont capables de réduire le fer ferrique (Fe(III)) et les sulfures (S₀). Leur métabolisme fermentaire permet la dégradation complète en dioxyde de carbone de substrats organiques comme l'éthanol, l'acétate le propionate et le butyrate (Cord-Ruwisch *et al.* 1998) (Coates *et al.* 2001)(Tableau III.4). Dans le réacteur B, elles apportent une voie métabolique alternative à l'activité acétoclaste des *Archaea* de la famille des *Methanosarcinaceae*.

III.4.3 Organisation spatiale du biofilm

Des échantillons de support colonisé on subit une hybridation (FISH) selon les protocoles décrits au chapitre "Matériels et méthodes". La combinaison de sondes utilisées a permis le marquage sélectif des populations d'*Archaea* (sondes *Archaea* ARC915 - FAM) et de bactéries (sondes bactéries EUB338 - CY3). Un marquage de l'ADN à la chromomycine a également été effectué afin de confirmer l'hybridation spécifique des groupes ciblés.

Ainsi nous avons pu visualiser directement par microscopie laser confocale à balayage les différents groupes de microorganismes marqués et leur arrangement spatial au sein du biofilm (Figure III.41 et Figure III.42).

La Figure III.41 présente le résultat d'un double marquage par la sonde *Archaea* (en rouge à la figure A1) et par la chromomycine (en bleu à la figure A2). Après superposition des images (Figure III.41 C1 et C2) on constate que, parmi tous les microorganismes dont l'ADN a été marqué par la chromomycine (toujours en bleu), seuls certains (en mauve) ont été ciblés par la sonde *Archaea*. Cette observation qui a pu être répétée pour l'hybridation des populations de bactéries avec la sonde EUB338 met en évidence que les sonde *Archaea* et bactéries se sont bien hybridées spécifiquement.

La Figure III.42 présente les images superposées réalisées après une double hybridation des bactéries et des *Archaea*. Alors que les observations réalisées par Batstone *et al.* (Batstone *et al.* 2004) montrent une organisation spatiale sous la forme d'une succession de couches des différents groupes trophiques au sein des granules issus de réacteurs UASB traitant certains types d'effluents de brasserie et de sucreries de canne, la répartition des groupes d'*Archaea* et de bactéries observée ici semble relativement homogène.

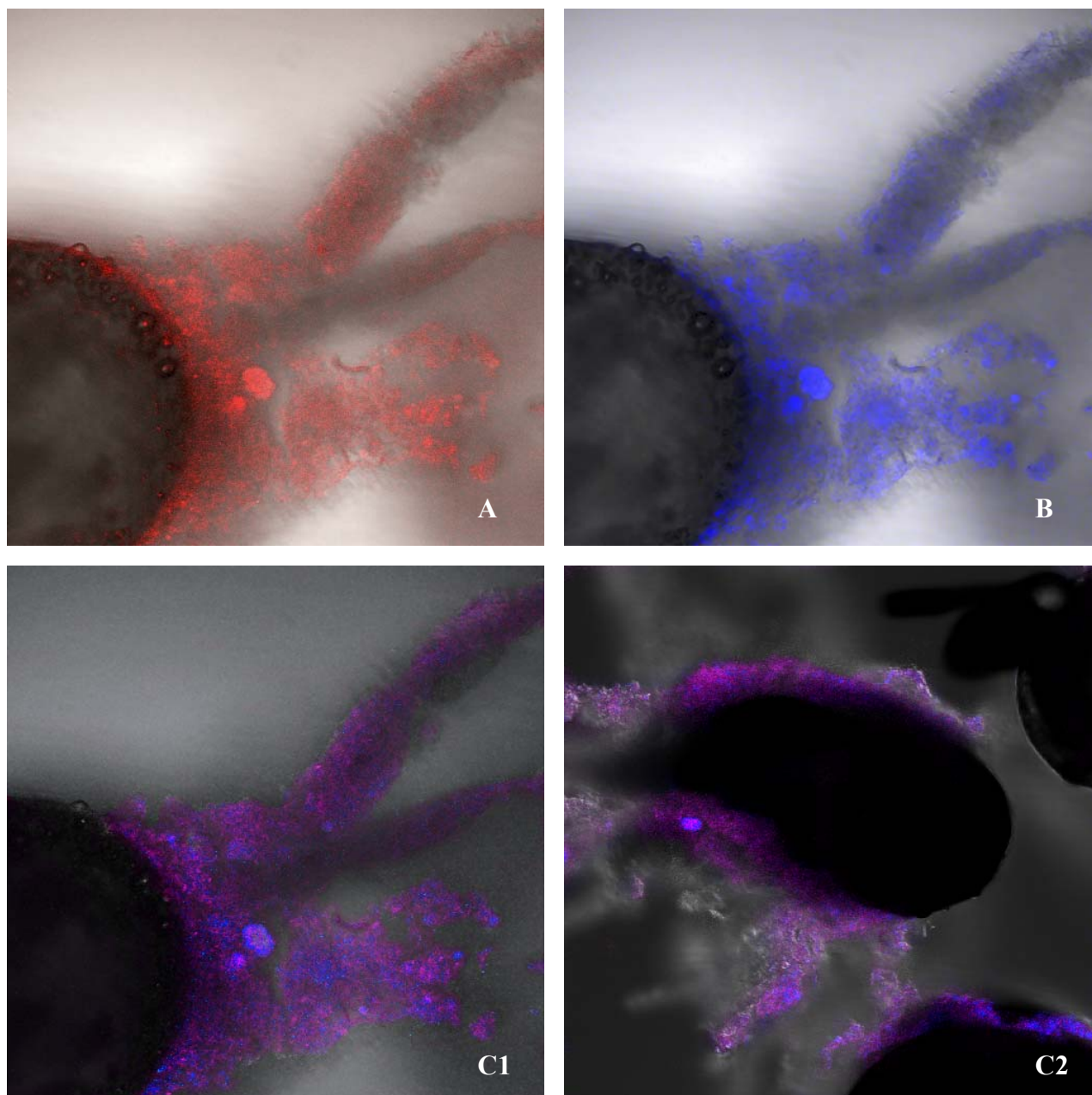


Figure III.41 : Observation par microscopie laser confocale et FISH des particules de support colonisées – Double marquage *Archaea* ARC915 – FAM (rouge) et Chromomycine (bleu) à fort grossissement (A,B,C1) et à faible grossissement (C2)

Toutefois, comme on peut le voir sur la Figure III.42 B2, les *Archaea* sont parfois regroupées sous la forme de petits amas eux même disséminés dans la totalité du biofilm sans localisation préférentielle.

Comme le suggèrent Batstone *et al.* (Batstone *et al.* 2004), la nature du substrat a vraisemblablement un impact prépondérant sur cette organisation spatiale des groupes trophique. Des substrats complexes composés de macromolécules organiques nécessitant une phase d'hydrolyse importante et limitante (tels que les effluents de sucrerie de canne) vont

être à l'origine d'une répartition plus marquée des différents groupes en couches. Schématiquement, les granules issus de digesteurs de sucreries, sont ainsi composés d'une couche fine externe de bactéries acidogènes, et d'une couche interne composée de bactéries syntrophes obligatoires et d'*Archaea* méthanogènes. Le centre du granule est la plupart du temps plus faiblement hybridé, voire non hybridé, indiquant ainsi une absence de cellules active.

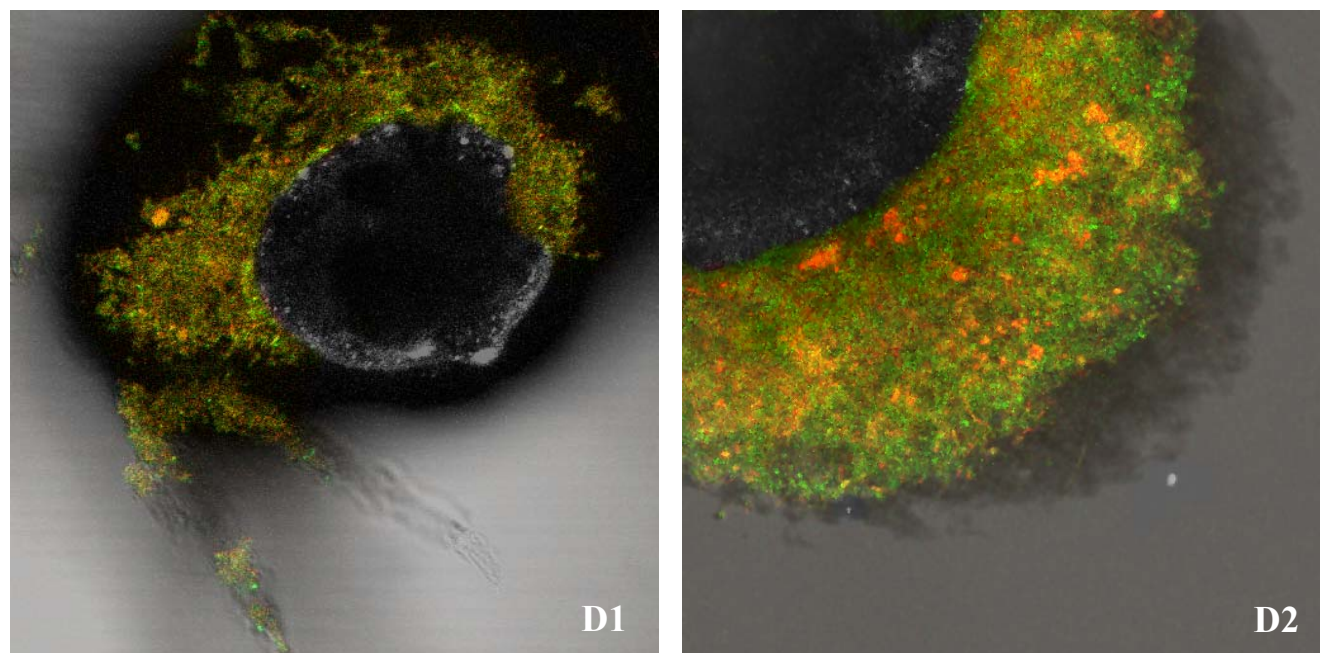


Figure III.42 : Observation par microscopie laser confocale et FISH des particules de support colonisées – Double marquage *Archaea* ARC915 – FAM (rouge) et bactéries EUB338 - CY3 colorée (vert) à faible (D1) et à fort grossissement (D2)

L'éthanol, qui est ici le principal substrat carboné, est une molécule facilement biodégradable, de faible encombrement stérique et très hydrophile. Ces propriétés lui permettent par conséquent de bien diffuser dans le biofilm. Etant donné sa formation récente (les prélèvements ayant été réalisés vers le 70^{ème} jour du démarrage), les phénomènes de transfert de matière au sein du biofilm sont sans doute facilités par sa faible épaisseur. Les bactéries dégradant l'éthanol n'étant pas limitées par l'accès au substrat, elles sont réparties dans tout le biofilm. De plus, les populations identifiées par Batstone *et al.* (Batstone *et al.* 2004) présentant la structure spatiale la plus organisée et la plus localisée étaient les bactéries acidogènes, or ce groupe n'est que peu représenté dans notre système.

L'arrangement spatial des populations d'*Archaea* et de bactérie au sein du biofilm semble donc dicté par la nature du substrat. Le fait que toutes les zones, même les plus profondes soient marquées indique que les microorganismes qui le composent sont

majoritairement viables et donc en état d'activité. Cette observation confirme l'hypothèse d'une diffusion de l'éthanol dans tout le biofilm et corrobore les fortes activités spécifiques mesurées dans les réacteurs.

III.4.4 Conclusions

Si aucun lien direct n'a pu être établi entre les populations présentes dans les digesteurs, leur dynamique et les stratégies de montée en charge testées, il apparaît que la plus grande biodiversité observée dans le réacteur B a un impact positif sur les performances et la stabilité du réacteur. L'écart observé entre les performances épuratoires des deux réacteurs et la plus grande stabilité fonctionnelle du réacteur B pourrait être expliqué par la présence d'un groupe de bactéries capables de dégrader les intermédiaires métaboliques produits (*Geobacter*). Un parallèle peut être établi entre nos observations et celles de Fernandez *et al.* (Fernandez *et al.* 1999) et de Zumstein *et al.* (Zumstein *et al.* 2000). Ces auteurs ont montré que la stabilité fonctionnelle apparente de deux digesteurs anaérobies indépendants sous-tendait une instabilité des populations assurant des fonctions métaboliques complémentaires. D'autres travaux (Fernandez *et al.* 2000) portant sur la comparaison de deux écosystèmes soumis à des chocs de charge organique, comme ce fut le cas pour le réacteur B, suggèrent que la communauté microbienne la plus stable est celle dont l'instabilité fonctionnelle est la plus grande. L'avantage de la biodiversité est également souligné par Schmidt et Ahring (Schmidt *et al.* 1999) qui montrent qu'un réacteur anaérobie inoculé avec deux espèces d'*Archaea* acétoclastes est plus stable et résistant aux perturbations qu'un autre digesteur inoculé avec une seule espèce. Tous ces travaux suggèrent un lien fort entre biodiversité et stabilité fonctionnelle des écosystèmes et ces suppositions sont également étayées par les résultats obtenus lors de notre étude. En effet, bien que les espèces microbiennes qui constituent le biofilm soient présentes à l'origine dans l'inoculum, leur abondance relative au sein du futur biofilm varie selon les conditions de croissance, la disponibilité des différents substrats, ainsi que de nombreux autres facteurs environnementaux. Le choix d'un inoculum adapté, en particulier au type d'effluent traité, est donc d'une importance cruciale lors de la phase de démarrage des réacteurs à biomasse fixés.

L'utilisation des outils moléculaires en relation avec le suivi des réacteurs a donc permis de mettre en relation la biodiversité et la dynamique des populations avec les performances et les conditions de mise en œuvre des réacteurs grâce à une approche métabolique de reconstruction.

III.5 Etude comparative des stratégies de montées en charge exponentielles par augmentation de la concentration (C_1) ou du débit d'alimentation(C_2) lors du démarrage des réacteurs à lit turbulent inverse

Nous avons comparé deux stratégies de montée en charge pour le démarrage des LTI :

- la *stratégie* C_1 : la CVA est augmentée quotidiennement par accroissement exponentiel de la concentration en carbone organique de l'effluent (C_i), depuis une concentration initiale (C_0), jusqu'à une concentration finale (C_f). Cette stratégie est réalisée avec un temps de séjour constant égal à un jour, qui permet un lessivage rapide des microorganismes apportés lors de l'inoculation et qui ne se sont pas fixés sur le support, ainsi que de la biomasse libre résultant du détachement du biofilm. L'objectif est de limiter au maximum l'impact de l'activité de ces microorganismes non fixés sur les performances épuratoires du réacteur.
- la *stratégie* C_2 : la CVA est augmentée quotidiennement par accroissement exponentiel du débit d'alimentation. La concentration de l'alimentation en matière organique reste constante ($20 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}$). Le temps de séjour hydraulique initial de 40 jours diminue selon une exponentielle décroissante jusqu'à une valeur égale à 1 jour à la fin de la période de démarrage (charge de l'ordre de $20 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Le lessivage des microorganismes de l'inoculum sera alors progressif et l'impact de leur activité sur les performances épuratoires du réacteur sera significatif pendant une bonne partie de la phase de démarrage.

Il s'agit de tester l'impact de chacune de ces stratégies sur la mise en place du biofilm anaérobie et plus largement le démarrage des réacteurs.

III.5.1 Conditions opératoires

La vitesse de gaz appliquée est identique pour les deux réacteurs, elle est égale à 1mm/s, ce qui correspond à la vitesse minimale de fluidisation par le gaz. Elle a été sélectionnée en fonction des résultats obtenus lors de l'étude hydrodynamique présentée au chapitre précédent, afin de minimiser les contraintes hydrodynamiques pour faciliter le développement d'un biofilm.

L'objectif fixé *a priori* pour cette étude est de traiter une charge volumique appliquée de $20 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ avec un rendement épuratoire minimal de 90% en réalisant la montée en charge en

trente jours. Ainsi, durant cette période, selon la suite géométrique décrite par les équations (12) à (14), l'accroissement théorique de la charge organique pour les deux réacteurs respecte une augmentation exponentielle de 13,1% par pallier quotidien depuis une CVA initiale (CVA_0) égale à $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ jusqu'à une CVA finale (CVA_f) égale à $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

- Pour le réacteur C_1 (R_{C1}), le débit de l'alimentation est fixé $7,24 \text{ L} \cdot \text{j}^{-1}$ (soit un TSH égal à 1 jour) et la DCO de l'effluent augmente d'une concentration initiale C_0 égale $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$ à une concentration finale C_f égale $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$.
- Pour le réacteur C_2 (R_{C2}), la composition de l'alimentation reste constante ($\text{DCO}=20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) et le débit d'alimentation augmente depuis une valeur de Q_0 égale à $0,181 \text{ L} \cdot \text{j}^{-1}$ (TSH égal à 40 jours) jusqu'à une valeur de Q_f égale à $7,24 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ (TSH égal à 1 jour).

Afin d'éviter tout phénomène de carence nutritionnelle, le milieu est complété par ajout d'une solution d'éléments traces métalliques dont la composition est détaillée au chapitre (III.1.1.3). $5 \mu\text{L}$ de cette solution sont ajoutés par litre d'effluent. Durant les 43 jours de l'expérience (30 jours de montée en charge et 13 jours de fonctionnement en régime stable), le suivi des paramètres de fonctionnement nous a permis de caractériser l'évolution de la mise en place et de l'activité de la biomasse, ainsi que les performances des réacteurs soumis aux deux stratégies.

III.5.2 Montée en charge et performances épuratoires

La charge volumique appliquée est théoriquement identique pour les deux réacteurs au même instant de la phase de démarrage. En pratique, si la concentration de l'alimentation en matière organique est une variable maîtrisée, le débit d'alimentation fait l'objet d'un contrôle automatique dépendant du pH afin d'éviter tout phénomène de surcharge organique : lorsque la valeur du pH devient inférieure à une valeur seuil fixée à 6,65, ce qui traduit une accumulation d'AGV, le débit d'alimentation est automatiquement réduit. La baisse temporaire du débit d'alimentation, et par conséquent de la CVA, permet à l'écosystème de résorber l'excès d'AGV, ce qui entraîne une remontée du pH. Le débit d'alimentation est alors restauré automatiquement à sa valeur nominale.

L'analyse de la Figure III.43 montre que cette régulation du débit est intervenue à plusieurs reprises, modifiant la montée en charge initialement prévue.

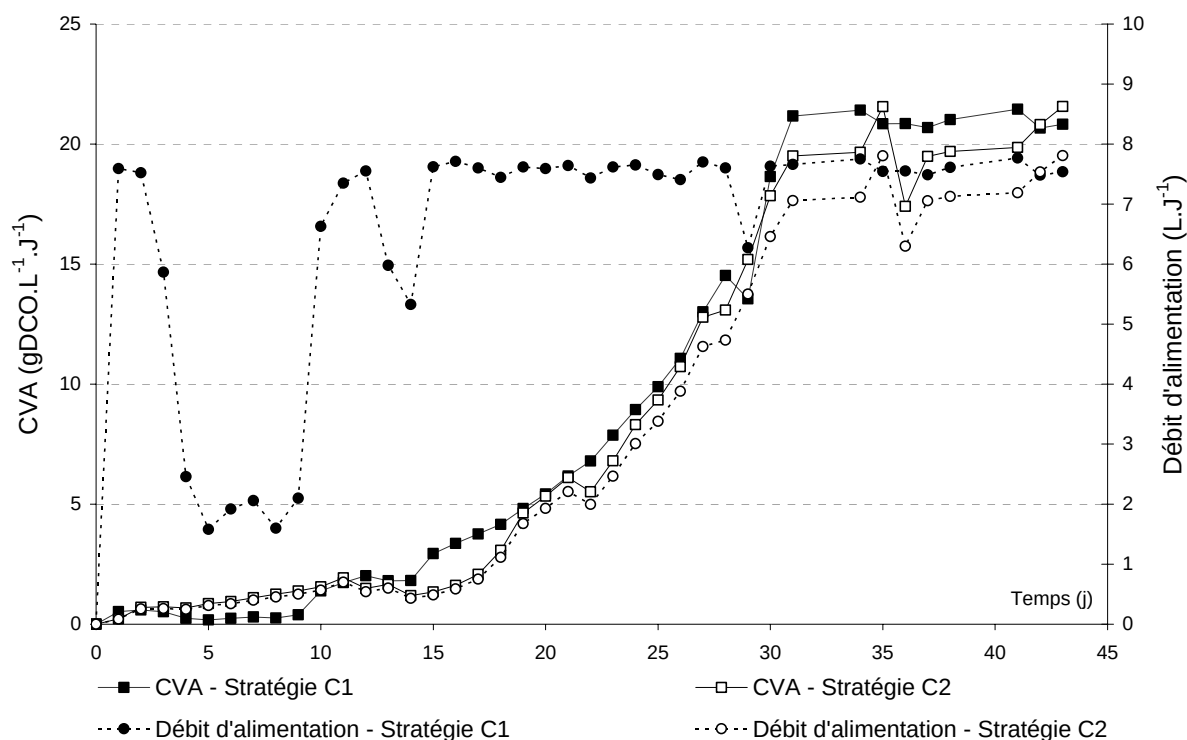


Figure III.43 : Stratégies C1 et C2- évolution de la CVA et du débit d'alimentation

Comme le montre la Figure III.44 la vitesse de dégradation de la DCO augmente progressivement pour les deux réacteurs en fonction de la CVA qui atteint une valeur finale fixée à $20 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ après trente jours. Au cours des six premiers jours, le calcul du rendement épuratoire donne des valeurs très faibles, voire négatives. Ce résultat n'est pas causé par un dysfonctionnement des procédés, mais est lié à l'apport important de matières organiques lors de l'inoculation qui n'est pas pris en compte pour le calcul du rendement. Un TSH court imposé par la stratégie C_1 permet de s'affranchir plus tôt de cet effet rémanent des matières organiques présentes dans l'inoculum. Ainsi, le R_{C1} atteint dès le 20^{ème} jour un rendement épuratoire supérieur à 90%. Pour la stratégie C_2 , le rendement épuratoire demeure plus faible sur toute la durée de l'étude, à une valeur moyenne de 75 % contre 82% pour la stratégie C_1 . La Figure III.44 montre que l'objectif épuratoire (une charge volumique appliquée de $20 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et un rendement épuratoire de 90%) est atteint au bout de trente et un jours pour la stratégie C_1 (soit un jour après la fin de la montée en charge) et quarante et un jours pour la stratégie C_2 . Le 43^{ème} jour, le rendement épuratoire est égal à 98% pour le réacteur C_1 et 88% pour le réacteur C_2 . La stratégie du lessivage rapide permet donc d'accéder plus rapidement et de manière durable à de meilleurs résultats en terme de performance épuratoire.

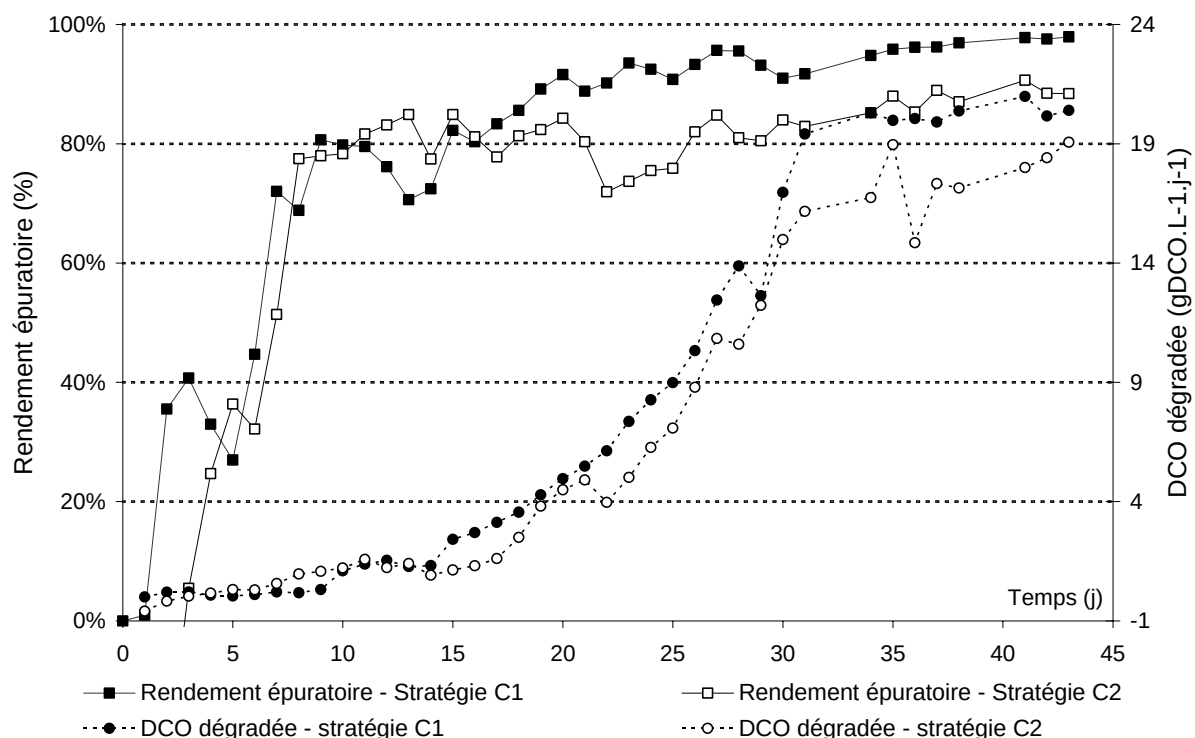
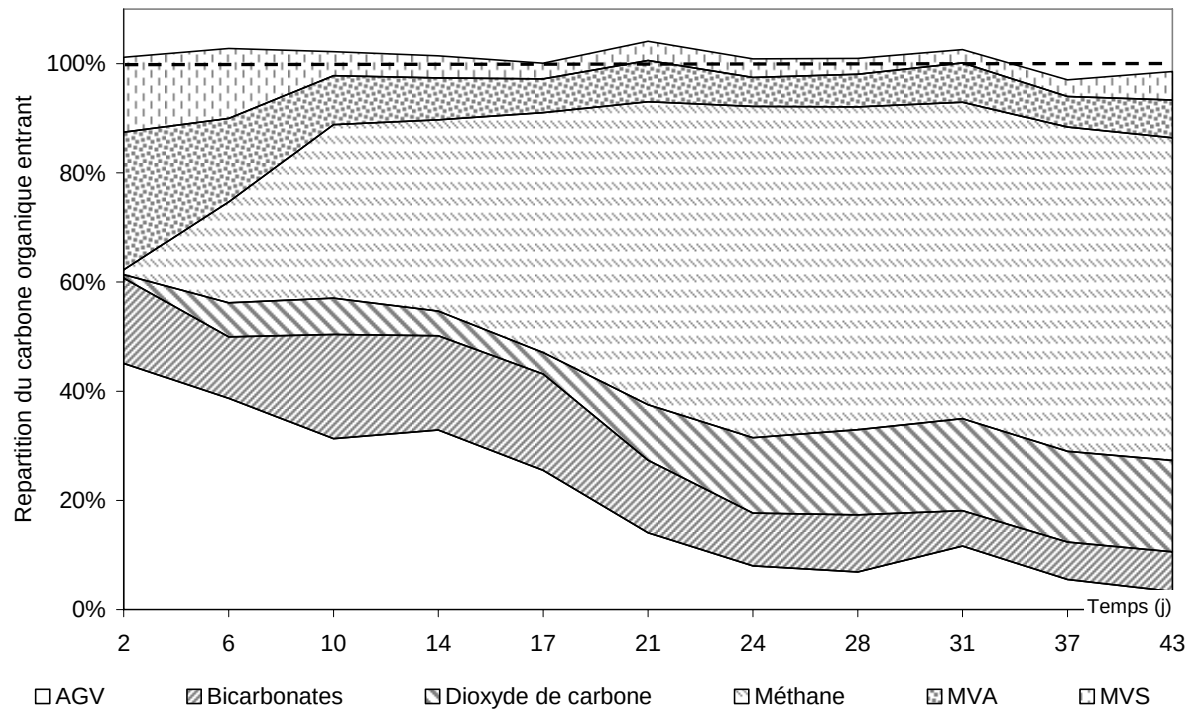
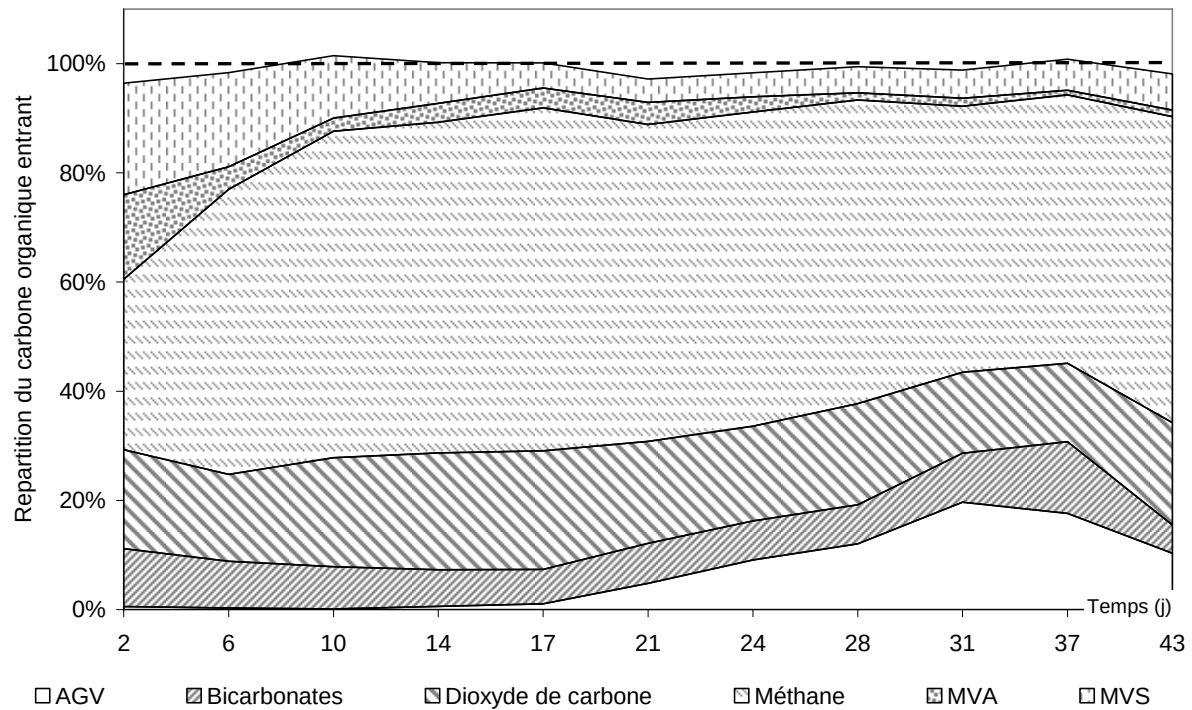


Figure III.44 : Stratégies C1 et C2- variation du rendement épuratoire et des quantités de DCO dégradée

La représentation graphique des bilans massiques pour les deux réacteurs est proposée aux Figure III.45 et Tableau III.6 pour la stratégie C₁ et aux Figure III.46 et Tableau III.7 pour la stratégie C₂. Mis à part lors des dix premiers jours durant lesquels la fraction du carbone entrant détournée vers la production de biomasse est importante, le catabolisme (dégradation de l'éthanol en AGV et en biogaz) représente une part constante des bilans massiques équivalente à 85% du carbone entrant. Cette activité catabolique est orientée vers la production de biogaz ou l'accumulation d'AGV selon la stratégie et la période considérée. Elle reflète l'activité des populations bactériennes responsables de la production d'AGV et des populations d'*Archaea* responsables de leur consommation et de la production de biogaz.

Figure III.45 : Stratégie C₁ - Distribution du carbone organique entrantTableau III.6 : Stratégie C₁ – Distribution du carbone organique au cours de chaque période

Jours	Durée (j)	AGV	HCO ₃ ⁻	CH ₄	CO ₂	MVA	MVS	Total
0 - 2	2	45.1%	15.6%	0.9%	0.7%	25.2%	13.7%	101.2%
2 - 6	4	38.7%	11.3%	18.5%	6.3%	15.3%	12.8%	102.8%
6 - 10	4	31.3%	19.1%	30.6%	7.4%	9.0%	4.4%	101.8%
10 - 14	4	32.9%	17.3%	35.0%	4.5%	7.7%	4.0%	101.4%
14 - 17	3	25.5%	17.7%	43.9%	3.9%	6.2%	2.9%	100.1%
17 - 21	4	14.0%	13.3%	55.5%	10.2%	7.6%	3.5%	104.1%
21 - 24	3	8.0%	9.7%	60.7%	13.8%	5.3%	3.4%	100.9%
24 - 28	4	6.9%	10.5%	59.1%	15.6%	6.0%	2.9%	101.0%
28 - 31	3	11.7%	6.5%	57.9%	16.8%	7.2%	2.4%	102.6%
31 - 37	6	5.5%	6.9%	59.4%	16.6%	5.6%	3.0%	97.0%
37 - 43	6	3.3%	7.3%	59.1%	16.7%	6.9%	5.3%	98.6%
Total	43	7.3%	9.1%	55.7%	14.9%	6.3%	4.2%	97.5%

Figure III.46 : Stratégie C₂- Distribution du carbone organique entrantTableau III.7 : Stratégie C₂– Distribution du carbone organique au cours de chaque période

Jours	Durée (j)	AGV	HCO ₃ ⁻	CH ₄	CO ₂	MVA	MVS	Total
0 - 2	2	0.5%	10.6%	31.2%	18.1%	15.5%	20.5%	96.4%
2 - 6	4	0.3%	8.6%	52.2%	15.9%	4.1%	17.2%	98.3%
6 - 10	4	0.1%	7.7%	58.2%	21.5%	2.4%	11.4%	101.4%
10 - 14	4	0.6%	6.7%	60.6%	21.4%	3.4%	7.4%	100.2%
14 - 17	3	1.1%	6.3%	62.8%	21.7%	3.6%	4.6%	100.1%
17 - 21	4	4.8%	7.3%	58.1%	18.7%	4.0%	4.3%	97.2%
21 - 24	3	9.1%	7.1%	57.6%	17.4%	2.8%	4.4%	98.3%
24 - 28	4	12.1%	7.1%	55.7%	18.5%	1.3%	4.8%	99.5%
28 - 31	3	19.7%	9.0%	48.7%	14.8%	1.5%	5.2%	98.8%
31 - 37	6	17.6%	9.3%	51.0%	12.5%	0.9%	5.6%	96.9%
37 - 43	6	10.3%	5.2%	56.1%	18.7%	1.2%	6.6%	98.1%
Total	43	13.1%	8.6%	53.8%	16.4%	1.5%	5.9%	99.2%

Pour le R_{C1} , les premiers jours du démarrage sont caractérisés par une forte production d'AGV. Durant cette période, les *Archaea* méthanogènes (responsables de la dégradation des AGV), dont les taux de croissance sont plus faibles que ceux des bactéries fermentaires sont proportionnellement peu présents au sein du biofilm. L'accumulation d'AGV dans le R_{C1} résulte d'une faible concentration en *Archaea* méthanogènes, et diminue progressivement avec l'augmentation de la proportion des *Archaea* acétoclastes dans le biofilm. Le 43^{ème} jour, la part du carbone organique entrant dédiée à la production d'AGV ne représente plus que 3,3% du bilan massique (Tableau III.6).

Concernant le R_{C2} , cette tendance est globalement inversée. Durant la première moitié de la phase de montée en charge, la concentration en AGV est faible (inférieure à 1% du bilan massique) et la quasi-totalité du carbone organique catabolisé est converti en biogaz (Tableau III.7). Cette forte activité méthanogène est le fait des bactéries libres présentes dans l'inoculum. Comme le montre la Figure III.50, l'augmentation quotidienne du débit d'alimentation du R_{C2} entraîne la diminution du TSH qui devient progressivement inférieur au taux de croissance des *Archaea* méthanogènes et entraîne leur lessivage progressif. Le 20^{ème} jour, le TSH du R_{C2} est égal à 3,75j, et les microorganismes dont les temps de doublement sont supérieurs à cette valeur ne peuvent plus se maintenir sous forme planctonique dans la phase liquide. Dans ce cas, le temps de doublement maximal est de l'ordre de $\ln(2) \times 3.75 = 2.60$ jours. La majorité des *Archaea* acétoclastes possèdent un temps de doublement minimal supérieur ; à titre d'exemple le temps une population de *Methanosaetaea* est caractérisée par un temps de doublement de l'ordre sept jours (Gujer *et al.* 1983) et va être lessivée. C'est pourquoi, lorsque le TSH augmente, on assiste à une diminution de l'activité méthanogène et à l'accumulation progressive d'AGV. A la fin de la montée en charge, la concentration totale d'AGV atteint des valeurs élevées supérieures à $2,5\text{g.L}^{-1}$: il s'agit principalement de l'acétate, produit direct de la fermentation de l'éthanol. Pour les deux réacteurs, après le 30^{ème} jour, la CVA est constante et identique ; la quantité de biomasse fixée continue à croître et les AGV sont rapidement consommés, comme on peut le constater aux Figure III.47 et Figure III.48. Globalement, comme le montre la comparaison des Tableau III.6 et Tableau III.6, l'accumulation d'AGV durant les quarante-trois jours de l'étude est deux fois moindre dans le cas de la stratégie C_1 , avec 7,3% du carbone entrant converti en AGV dans le cas de la stratégie C_1 et 13,1% dans le cas de la stratégie C_2 .

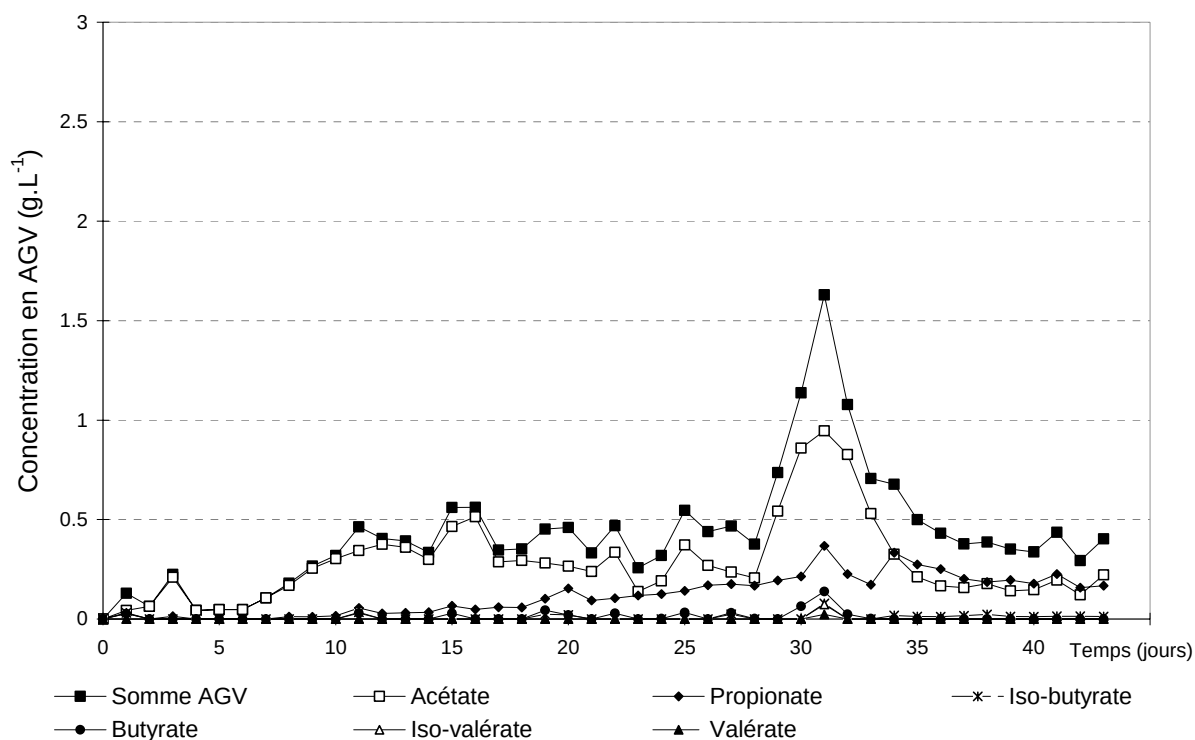


Figure III.47 : Stratégie C_1 – évolution de la concentration en AGV

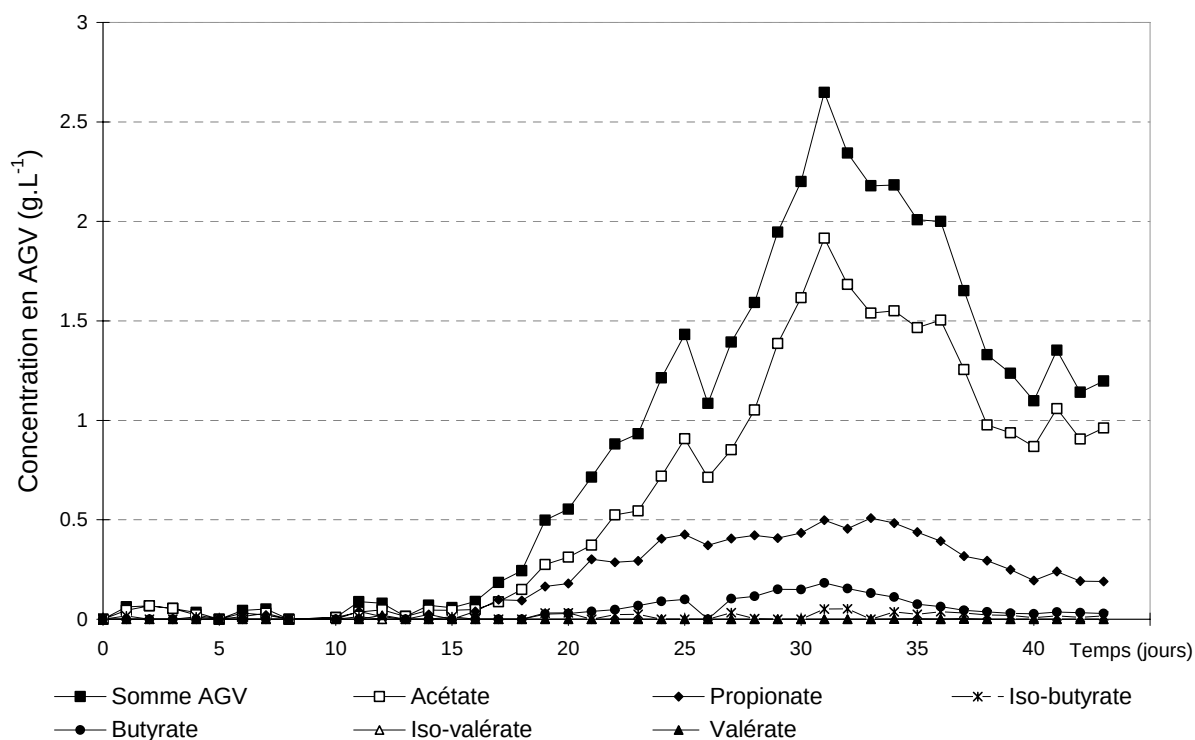


Figure III.48 : Stratégie C_2 – évolution de la concentration en AGV

III.5.3 Croissance du biofilm : compétition entre biomasse libre et biomasse fixée

La détermination des matières volatiles attachées (MVA) pour chaque réacteur a permis de suivre la formation du biofilm sur le support au cours du temps (Figure III.49). L'accumulation de biomasse sur le support est plus importante dans le cas de la stratégie C1 et semble proportionnelle à l'augmentation de la charge. Le 43^{ème} jour la quantité de biomasse fixée est 4,5 fois plus importante dans le cas de la stratégie C₁ (Figure III.51). Comme le montre les Figure III.45 et Figure III.46 et les Tableau III.6 et Tableau III.7, la quantité de carbone dédié à la production de biomasse est très importante durant les jours qui suivent l'inoculation. Ces valeurs témoignent d'une forte croissance mais également des phénomènes de fixation des microorganismes sur le support, en particulier des mécanismes passifs d'adhésion. La nature micro-particulaire, la très grande surface spécifique développée, et les propriétés du support utilisé (porosité, rugosité) facilitent les phénomènes d'adsorption des microorganismes aux surfaces.

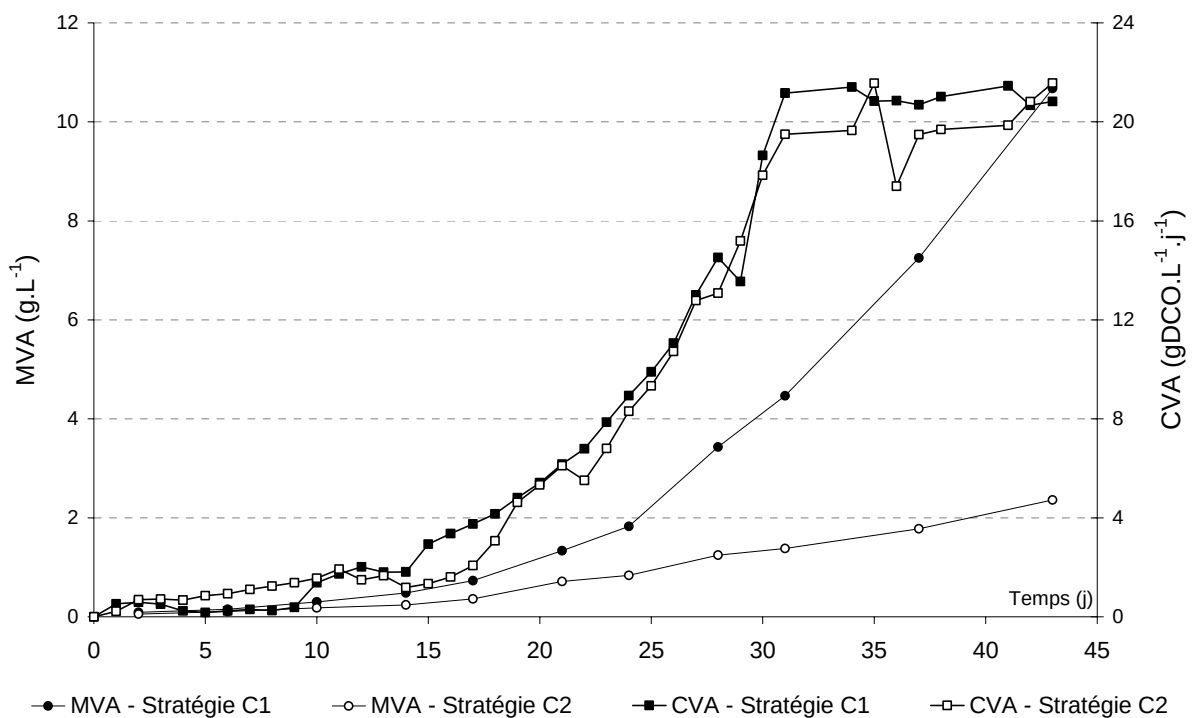


Figure III.49 : Stratégie C₁ et C₂- accumulation de MVA et évolution de la CVA au cours du démarrage

L'analyse des bilans massiques montre que durant les dix premiers jours, 30 à 34% du carbone entrant est métabolisé pour produire de la biomasse. Dans le cas de la stratégie C₁, la majorité du carbone métabolisé est utilisé pour produire de la biomasse fixée (25%). Cette forte croissance du biofilm est liée au lessivage précoce des microorganismes planctoniques

du R_{C1} , obligeant les microorganismes à croître sous forme fixée. Ce rapport est inversé dans le cas de la stratégie C_2 , pour laquelle 15% du carbone entrant est dédié à la production de biomasse fixée contre 20% dédié à la production de biomasse libre.

Les MVS correspondent à la fraction organique de la matière en suspension et reflètent la quantité de biomasse présente dans la phase liquide au sein de chaque réacteur. L'évolution de la quantité de MVS pour chaque stratégie est présentée à la Figure III.50.

Un bilan matière sur quantité de biomasse met en jeu plusieurs termes " *sources* " et " *puits* ". La " production " de biomasse en suspension peut avoir deux origines endogènes :

- La croissance et la multiplication cellulaire sous forme libre dans la phase liquide lorsque les conditions le permettent. C'est un phénomène vraisemblablement prépondérant le cas du R_{C2} durant toute la première partie de l'expérience lorsque le temps de séjour est encore long (supérieur au temps de doublement des populations microbiennes anaérobies).
- Le détachement de fragments du biofilm et le retour de microorganismes fixés à l'état planctonique. C'est un phénomène classiquement décrit comme faisant partie, au même titre que la croissance, des mécanismes de développement du biofilm.

L'alimentation étant exempte de matière en suspension, le débit d'alimentation du réacteur en continu va fixer le lessivage de cette biomasse : c'est l'unique terme " *puits* ". L'accumulation de biomasse libre dans le LTI est directement liée aux deux termes de " production " et au lessivage. La quantité initiale de biomasse en suspension a pour origine l'introduction au début du démarrage d'une quantité massive de boue destinée à inoculer le réacteur.

Comme on peut le constater sur la Figure III.51 dans le cas du R_{C1} , la concentration en biomasse libre diminue rapidement au début de l'expérience. Le TSH fixé à 1 jour dès le début de l'alimentation en continu a pour conséquence de permettre le lessivage rapide de la biomasse apportée lors de l'inoculation. En effet, la vitesse d'élimination de la biomasse libre par lessivage est prépondérante par rapport à la vitesse de croissance des microorganismes sous leur forme planctonique ; de plus, le taux de détachement est négligeable, puisque la quantité de biomasse fixée est faible. Au début de l'expérimentation, la biomasse est majoritairement (à plus de 85%) sous forme libre (Figure III.51). Cette tendance s'inverse rapidement vers le 5^{ème} jour, et à partir du 10^{ème} jour plus de 90% de la biomasse présente dans le R_{C1} est fixée au support. La concentration en MVS diminue donc rapidement durant les tous premiers jours pour atteindre des valeurs très faibles comprises entre 0,03 et 0,04 g.L⁻¹ entre le 10^{ème} et le 17^{ème} jour. Vient ensuite une phase d'augmentation de la concentration en biomasse libre due à l'augmentation des phénomènes de détachement.

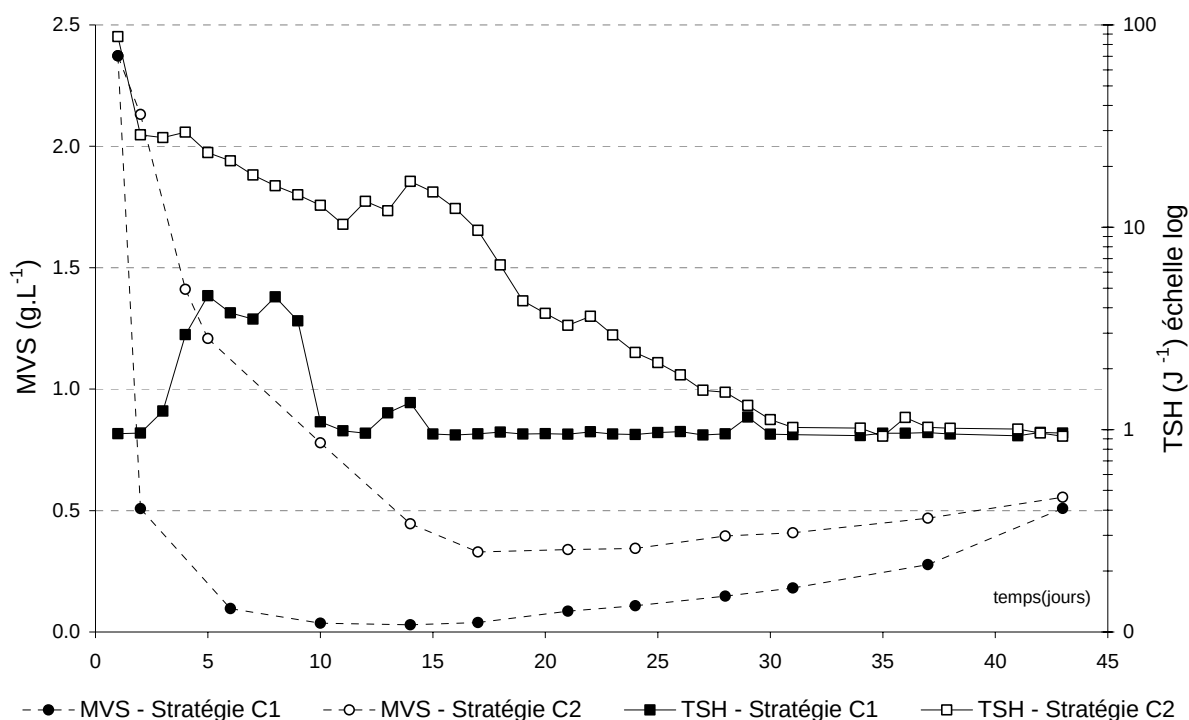


Figure III.50 : Stratégies C1 et C2- évolution des MVS et du TSH

Concernant le R_{C2} (Figure III.50), la quantité de MVS diminue plus lentement à cause de la compétition entre la vitesse de production de biomasse libre par croissance cellulaire et la vitesse d'élimination de biomasse libre par lessivage (TSH élevé). Lorsque la charge est augmentée, la vitesse de lessivage augmente. Ainsi, la concentration en MVS atteint un seuil inférieur de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ le 17^{ème} alors que le seuil minimum était atteint dès le 10^{ème} jour dans les cas du R_{C1} . Elle atteint ensuite des valeurs supérieures à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Comme le montre la Figure III.51, la biomasse libre est largement majoritaire au sein du réacteur durant les quinze premiers jours, la tendance s'inverse lentement vers le 17^{ème} jour, mais le pourcentage de biomasse fixée n'est que de 80% de la biomasse totale du réacteur le 43^{ème} jour. La biomasse libre n'est donc à aucun moment négligeable, comme c'est le cas pour le $RC1$ à partir du 10^{ème} jour. Elle joue vraisemblablement un rôle actif dans les processus de dégradation tout au long des 30 jours de montée en charge et des treize jours de stabilisation. Plus généralement, les conditions opératoires étant identiques pour les deux réacteurs à partir du 30^{ème} jour (TSH = 1 jour), la quantité de biomasse libre converge vers des valeurs proches de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ à la fin de l'expérience dans les deux réacteurs (Figure III.50).

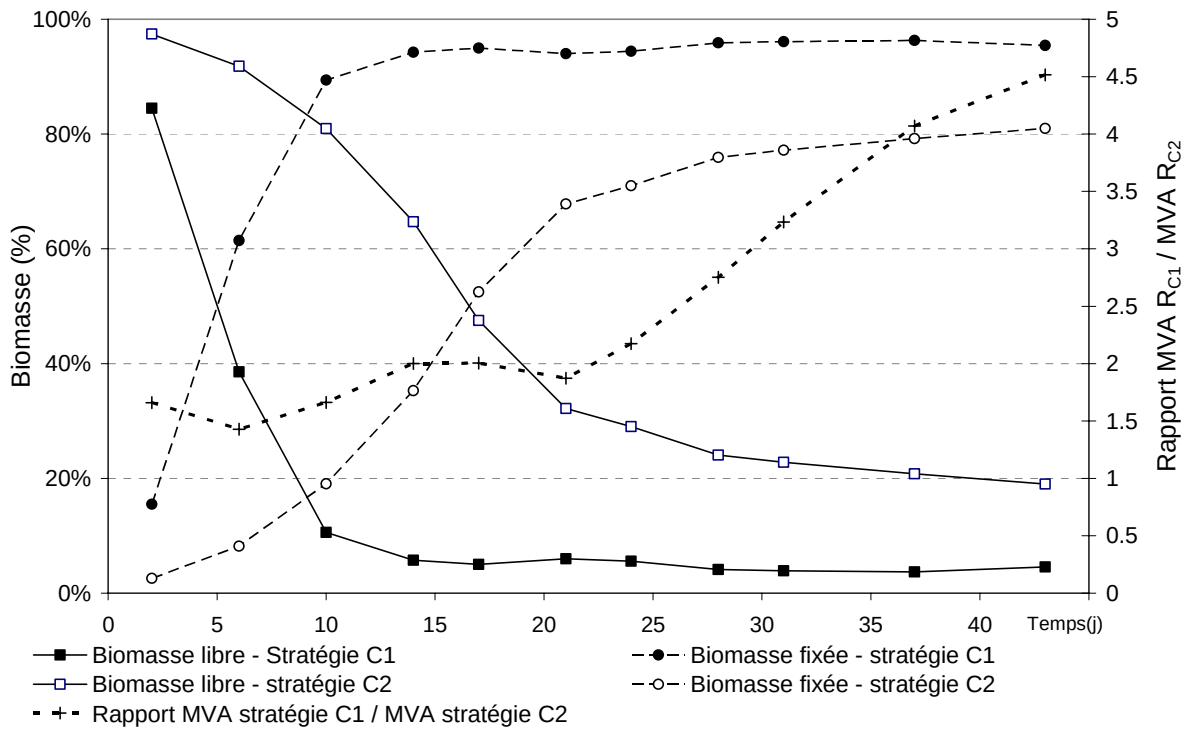


Figure III.51 : Stratégie C_1 et C_2 — évolution du pourcentage de biomasse libre et de biomasse fixée en fonction du temps et rapport de concentration en biomasse attachée

L'analyse granulométrique des particules de support colonisées prélevées le 35^{ème} jour est présentée à la Figure III.52. Les courbes de distribution volumique des particules en fonction des diamètres équivalents suivent globalement une loi normale. La moyenne et la médiane des diamètres équivalents (définie comme le diamètre équivalent répartissant les termes de la série en deux groupes de même pourcentage volumique) et les intervalles de répartitions sont présentés au Tableau III.8. Leurs valeurs diffèrent suivant la stratégie de démarrage.

Tableau III.8 : Valeur de la moyenne, de la médiane et intervalle de répartition des diamètres équivalents des objets analysés au granulomètre (particules de support et fragments de biofilm détaché) à partir des échantillons de support colonisé prélevés le 35^{ème} jour pour les réacteurs C_1 et C_2 , et à partir d'un échantillon de support vierge.

	Moyenne des diamètres équivalents (μm)	Médiane des diamètres équivalents (μm)	Intervalle de répartition (μm)
R_{C1} support colonisé	256	221	0,791 – 493
R_{C2} support colonisé	213	203	2,66 – 373
Support vierge	194	196	76,42 – 256

La taille moyenne des particules colonisées augmente en fonction de la progression de la colonisation. Cette augmentation du diamètre moyen confirme les mesures de MVA et les

observations microscopiques réalisées sur ces mêmes échantillons (Figure III.53). Ils montrent l'état plus avancé de la colonisation du support dans le cas de la stratégie C₁ à la fin de la montée en charge.

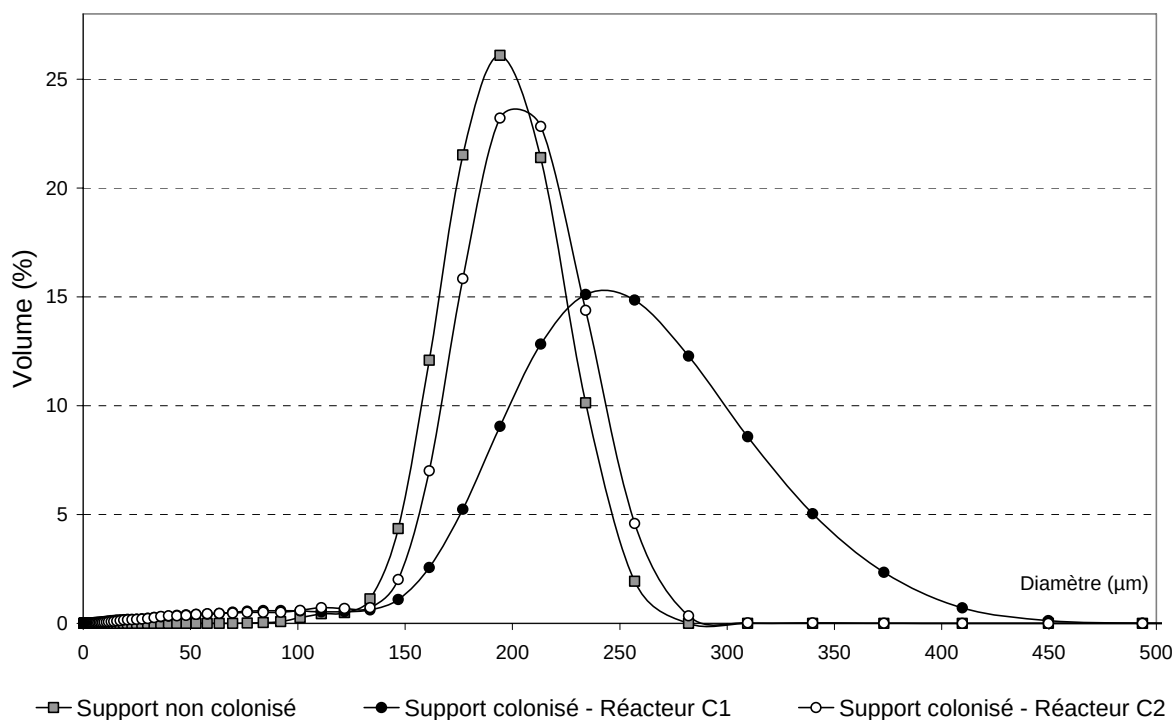


Figure III.52 : Répartition granulométrique par classe de diamètre équivalent de particules de support colonisées prélevées le 35^{ème} jour et de particules de support vierges

L'aspect général de la courbe de distribution volumique des particules les moins colonisées est semblable à celle des particules vierges. On observe une augmentation de l'intervalle de répartition. Cette évolution traduit une tendance à une colonisation non homogène des particules. La différence de la vitesse de colonisation d'une particule à l'autre est vraisemblablement due à l'hétérogénéité des propriétés de surface du support. En effet, les particules peuvent être plus ou moins lisses, irrégulières voire très irrégulières. Ces propriétés peuvent avoir un impact direct sur la mise en place et la croissance du biofilm qui va croître préférentiellement sur les particules les moins lisses à "l'abri" des contraintes mécaniques responsables du détachement.

L'accroissement de l'écart entre la moyenne et la médiane des diamètres (la médiane est dans ce cas inférieure à la moyenne) traduit une augmentation du nombre de petits objets, dont les valeurs de diamètre équivalent se situent en dessous de 76 µm et dont la fraction volumique n'est pas significative. Ces petites particules ne sont vraisemblablement pas du

support, comme on peut le constater à la Figure III.53, elles correspondent à des fragments de biofilm détaché. Leur présence est due aux phénomènes de détachement qui s'accroissent au fur et à mesure de l'accumulation de biomasse sur le support.

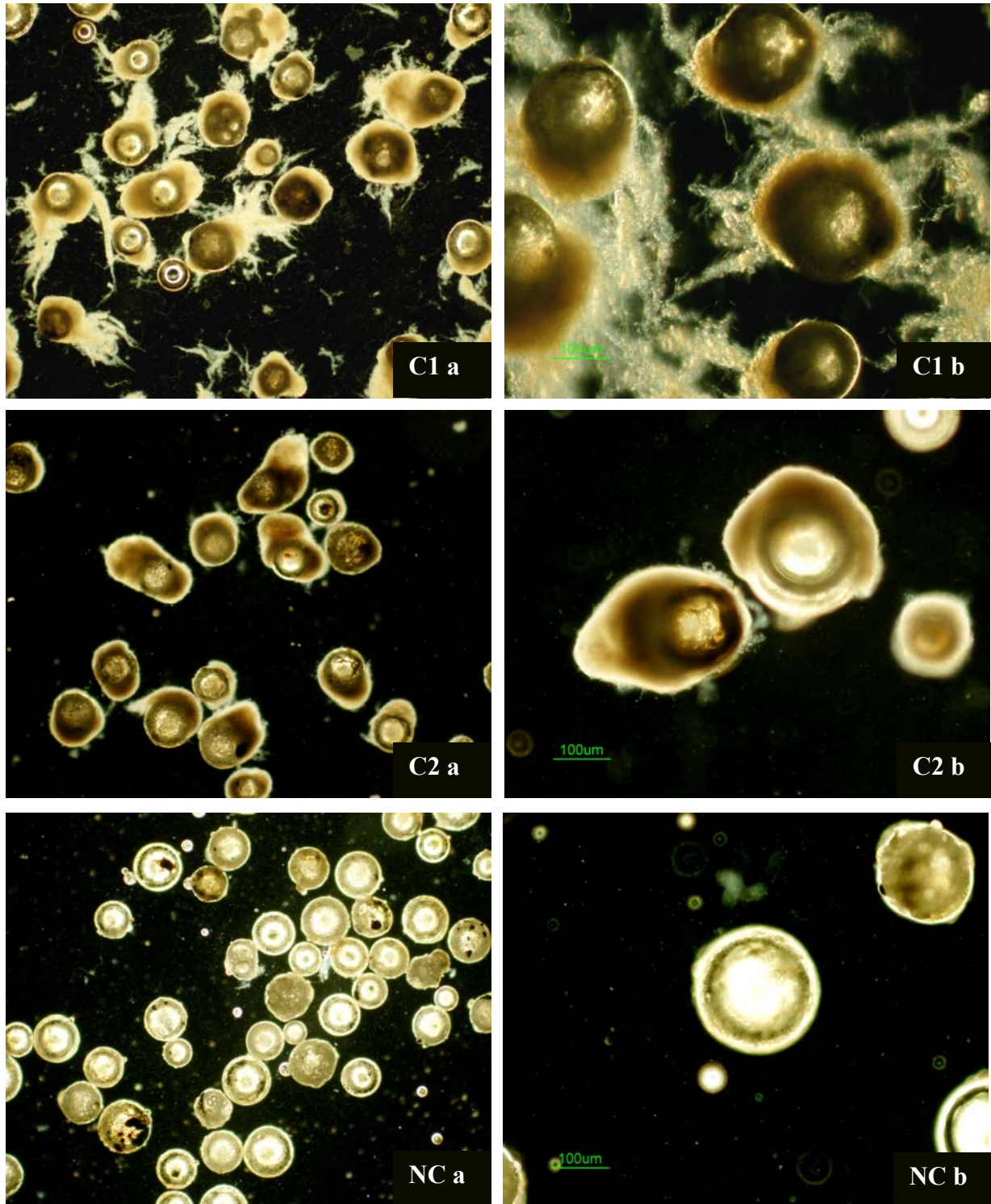


Figure III.53 : Support colonisé prélevé le 35^{ème} jour - réacteur C₁ et réacteur C₂, et support non colonisé (NC), objectifs x10 (a) x 40 (b)

III.5.4 Activité

Le calcul de l'activité spécifique de la biomasse totale est réalisé à partir de la mesure des MVA et des MVS. Elle rend compte de l'activité spécifique globale de la biomasse attachée et de la biomasse détachée. Son évolution est représentée à la Figure III.54.

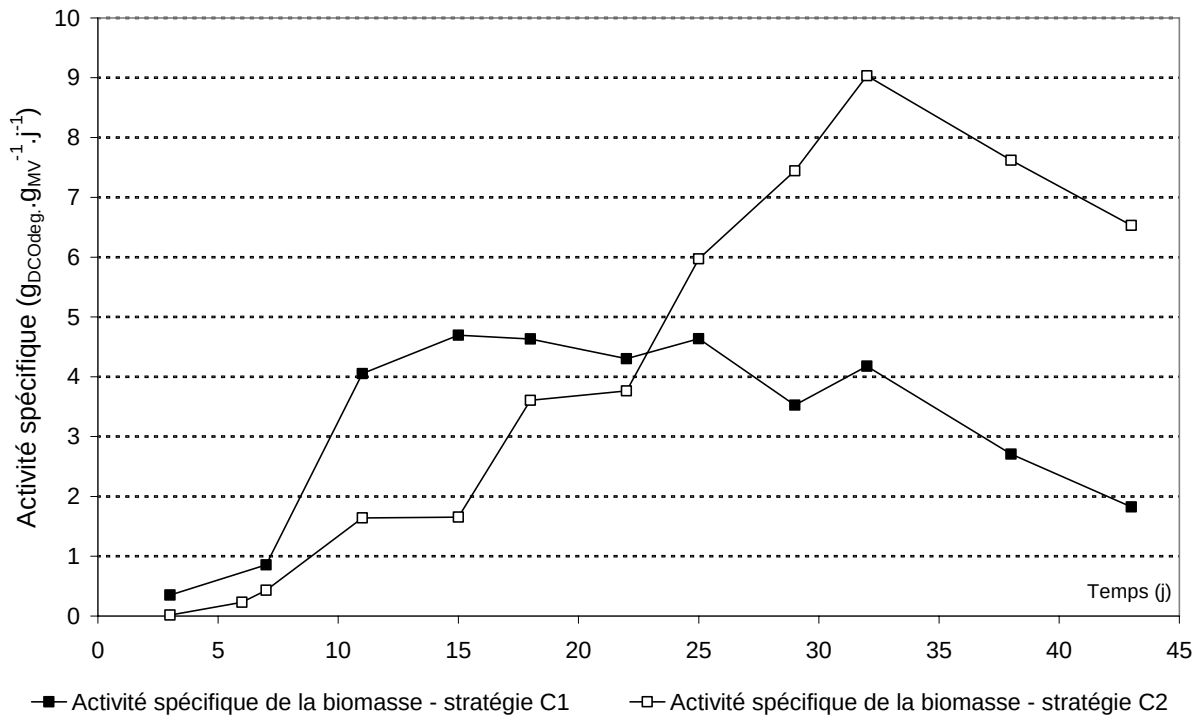


Figure III.54 : Evolution de l'activité spécifique de la biomasse

Deux tendances peuvent être relevées selon la stratégie utilisée :

- concernant le R_{C1} , après une augmentation durant les dix premiers jours, la valeur d'activité spécifique se stabilise autour d'une valeur de $4,4 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{g}_{\text{MV}}.\text{j}^{-1}$. Le lessivage est rapide, les concentrations en MVS sont faibles et la biomasse libre participe peu à l'activité d'épuration. Ainsi, l'activité spécifique est globalement représentative de la biomasse attachée. Comme l'activité spécifique reste constante, les organismes fixés sur le support se multiplient en conservant la même activité. En fin d'expérience, l'activité spécifique diminue. Ce résultat peut être lié à l'augmentation de l'épaisseur du biofilm qui peut entraîner des problèmes de diffusion dans les zones les moins accessibles. La valeur moyenne d'activité pour les quarante-trois jours du démarrage est égale à $3,2 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{g}_{\text{MV}}.\text{j}^{-1}$;
- concernant le R_{C2} , l'activité spécifique augmente durant les trente premiers jours jusqu'à $9,1 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{g}_{\text{MV}}.\text{j}^{-1}$ puis diminue. L'activité globale augmente ainsi avec la charge et la diminution de la concentration en biomasse libre par rapport à la biomasse fixe. Au 30^{ème}

jour, 80% de la biomasse est sous forme libre, et l'épaisseur du biofilm est faible (valeur équivalente au 20^{ème} jour du R_{C2}). Ainsi, par rapport au R_{C2}, l'activité du biofilm est plus importante puisque les limitations diffusionelles dans biofilm doivent être plus faibles, et que la concentration en DCO résiduelle est plus importante. Ces valeurs très élevées sont donc la conséquence d'une colonisation lente du support provoquée par un TSH élevé. La valeur moyenne de l'activité spécifique du R_{C2} est égale à $4 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{g}_{\text{MV}}.\text{j}^{-1}$!

Dans les deux cas, la diminution de l'activité spécifique observée après le 30^{ème} jour est liée au même phénomène. La charge polluante à traiter reste stable alors que la quantité de biofilm continue de croître. Ainsi, il y a de plus en plus de biomasse pour traiter la même charge. Toutefois les faibles concentrations en AGV observées dans le R_{C1} nous permettent de penser que ce réacteur ne fonctionnait donc pas au maximum de sa capacité et aurait pu traiter des CVA plus importantes.

Les Figure III.16 et Figure III.56 indiquent les proportions en dioxyde de carbone et en méthane mesurées dans la phase gazeuse, ainsi que le débit du biogaz produit par les deux réacteurs.

Dans le cas de la stratégie C₁, la production de biogaz est faible et comprise entre 0,009 et 0,04 L.h⁻¹ durant les neuf premiers jours. Le débit augmente ensuite proportionnellement à l'augmentation de la CVA pour stagner à 2,65 L.h⁻¹ à partir du 30^{ème} jour. La proportion de méthane dans le biogaz augmente moins rapidement que dans le cas de la stratégie C₂ et atteint des valeurs proches ou supérieures à 80% à partir du 13^{ème} jour.

Dans le cas de la stratégie C₂, l'activité méthanogène débute dès les premiers jours de l'alimentation en continue, le débit de biogaz mesuré est supérieur à 0,1 L.h⁻¹ dès le deuxième jour. A partir du 6^{ème} jour, le rapport CO₂/CH₄ se stabilise à des valeurs proches de 1/3. Cette forte production de biogaz est le fait des microorganismes libres apportés lors de l'inoculation qui dégradent à la fois l'éthanol contenu dans l'effluent mais également la matière organique apportée par l'inoculum. A la fin de la phase de démarrage (30^{ème} jour), le débit est faible par rapport à la stratégie C₁ au même instant, mais le débit continue à croître. Il atteint un palier le 43^{ème} jour, avec une valeur de 2,34 L.h⁻¹ qui reste inférieure à la valeur maximum obtenue pour l'autre stratégie. Ce résultat témoigne de la dégradation incomplète de la matière organique (rendement d'épuration plus faible) et de l'accumulation d'AGV.

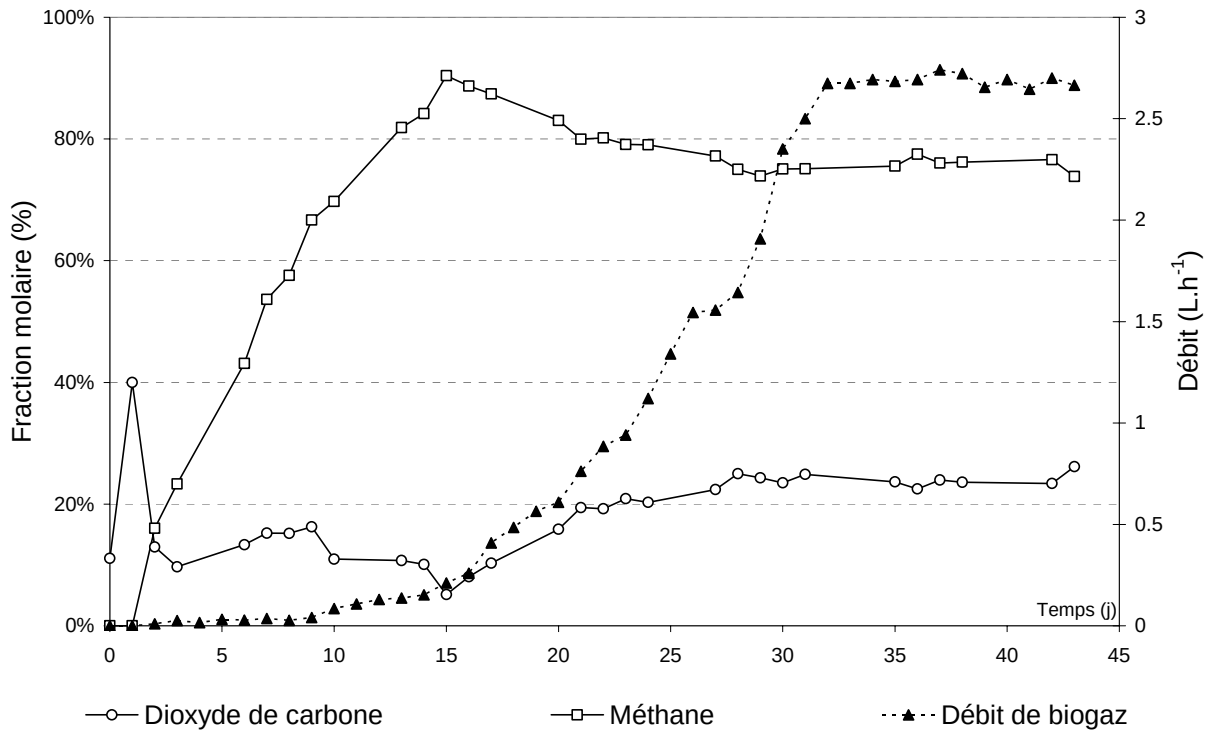


Figure III.55 : Stratégie C_1 - évolution de la composition de la phase gazeuse en dioxyde de carbone et méthane et du débit de biogaz

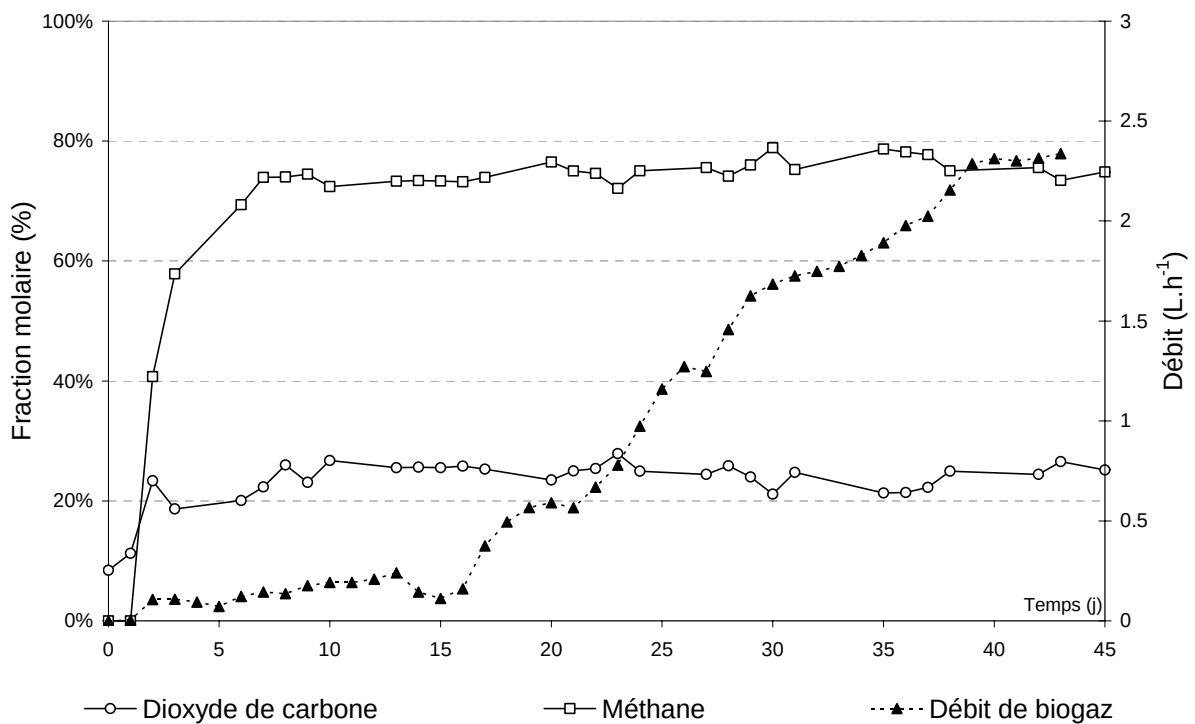


Figure III.56 : Stratégie C_2 - évolution de la composition de la phase gazeuse en dioxyde de carbone et méthane et du débit de biogaz

La mesure de la composition et du débit du biogaz nous a permis de calculer le rendement méthane (Figure III.57).

Concernant le R_{C1} , il augmente progressivement durant les huit premiers jours pour se stabiliser à $0,34 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCOdeg}}^{-1}$. Deux phénomènes semblent être à l'origine du faible rendement observé au début de l'expérimentation. D'une part, une grande partie du métabolisme des microorganismes est détournée vers la production de biomasse. D'autre part, les *Archaea* méthanogènes sont peu présentes dans la phase liquide (elles ont été lessivées) et elles sont peu présentes dans le biofilm puisqu'elles possèdent un taux de croissance faible par rapport aux bactéries fermentaires, ceci est également confirmé par l'accumulation d'AGV dans le réacteur (Tableau III.6). Le rendement méthane augmente donc durant les huit premiers jours en fonction du quorum des *Archaea*.

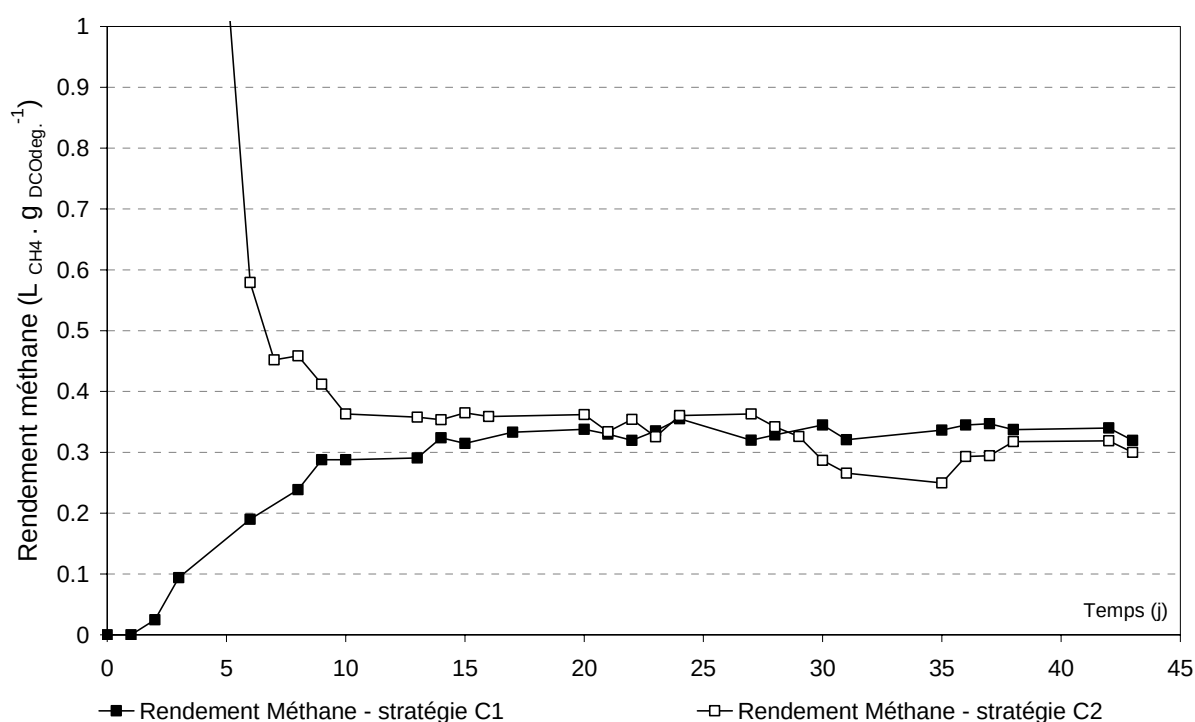


Figure III.57 : Stratégie C₁ et C₂ - évolution du rendement méthane

Durant les dix premiers jours, pour le R_{C2} , on observe des valeurs du rendement en méthane très élevées de $2,1 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCOdeg}}^{-1}$. Ces valeurs extrêmes du rendement en méthane sont théoriquement impossibles à atteindre. Elles sont le fait de la biomasse libre, majoritaire dans le R_{C2} à cause d'un TSH long, qui dégrade les molécules organiques apportées par l'inoculum en produisant du biogaz. Cette voie de production de biogaz est majoritaire pour le R_{C2} au début de l'expérimentation et entraîne la surestimation du rendement méthane. Les

rendements calculés pour les deux réacteurs convergent jusqu'à atteindre des valeurs équivalentes ($0,35 \text{ L}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{DCO}_{\text{dég}}}^{-1}$) et proches du maximum théorique durant la dernière moitié de l'étude.

III.5.5 Conclusions

Les deux stratégies testées ont permis la montée en charge en trente jours jusqu'à une CVA égale à $20 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ selon l'objectif fixé initialement. La stratégie C_1 démontre néanmoins des avantages significatifs :

- en terme de performances, le rendement épuratoire est globalement plus élevé et la quantité de carbone organique converti en biogaz plus importante. Ainsi, la quantité de carbone organique non traité retrouvée en sortie sous forme d'AGV représente 7,3% de la totalité du carbone apporté durant les 43 jours de l'étude, contre 13,1% pour la stratégie C_2 . De plus l'objectif de 90% d'épuration de la CVA est atteint le 31^{ème} jour dans le cas de la stratégie C_1 et 41 jours dans le cas de la stratégie C_2 ;
- du point de vue de la croissance du biofilm, la stratégie du lessivage rapide de la biomasse libre et le temps de séjour court limite le développement des microorganismes dans la phase liquide et favorise fortement la croissance du biofilm. Ainsi, à la fin de l'étude, la concentration en biomasse fixée au sein du réacteur est 4,5 fois plus importante dans le cas de la stratégie C_1 .

Dans le cas de la stratégie C_2 , la quantité d'AGV accumulés augmente fortement à partir du 20^{ème} jour et jusqu'à la fin de la phase de montée en charge pour atteindre des concentrations supérieures à $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. L'activité spécifique de la biomasse est également extrêmement élevée et atteint $9 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{g}_{\text{MV}} \cdot \text{j}^{-1}$ le 32^{ème} jour. A la fin de la montée en charge, on constate donc que le réacteur C_2 est en surcharge, la quantité de biomasse retenue dans le réacteur n'est plus suffisante pour permettre la dégradation de la matière organique apportée. Dans ce cas de figure, poursuivre l'augmentation de la CVA selon la même cadence jusqu'à des valeurs significativement plus élevées, aurait vraisemblablement conduit à une dérive du système vers acidogenèse et une forte inhibition de l'activité méthanogène.

La stratégie C_1 paraît donc plus appropriée dans l'optique d'un démarrage rapide des réacteurs à lit turbulé inverse et également afin de favoriser la croissance du biofilm.

III.6 Optimisation du démarrage d'un réacteur à lit fixe ascendant

L'objectif de cette étude est d'extrapoler certaines des stratégies de démarrage étudiées à l'échelle pilote sur un réacteur préindustriel (1m^3) alimenté par un effluent réel. En complément du suivi hors ligne des paramètres de fonctionnement, l'instrumentation très riche du digesteur permet de suivre les débits liquides d'alimentation et de recirculation, le pH, la température, la pression du dôme, le débit de biogaz produit et sa composition en CH_4 , CO_2 , les bicarbonates, les acides gras volatils totaux (AGVtot), le carbone organique total (COT), et les alcalinités partielle (AP) et totale (AT).

Trois démarrages successifs d'un réacteur à lit fixe (LF) alimenté en flux ascendant ont été réalisés à partir d'un support vierge selon deux stratégies de montée en charge :

- le démarrage A a été effectué selon la *stratégie A* ou stratégie de l'épuration maximale, basée sur une augmentation par paliers de la CVA en fonction du rendement épuratoire,
- les démarrages C_{11} et C_{12} ont été réalisés selon la *stratégie C* (également notée C_1 dans la partie précédente concernant l'étude de la phase de démarrage des LTI), basée sur une augmentation exponentielle de la CVA par accroissement de la concentration de l'alimentation à TSH constant

Dans un premier temps, les résultats obtenus lors des démarrages A et C_{11} sont présentés ; ils ont permis d'analyser l'impact des stratégies A et C sur la vitesse ou durée du démarrage, les performances des réacteurs et la mise en place du biofilm dans le cas d'un réacteur à lit fixe (LF) alimenté en flux ascendant par un effluent industriel.

Dans un second temps, nous présentons les résultats obtenus lors du démarrage C_{12} au cours duquel il s'est produit un incident technique. Ils ont permis d'évaluer la robustesse du procédé démarré.

III.6.1 Conditions opératoires

Le digesteur décrit dans la partie II.1.2 du chapitre " Matériels et méthodes " est équipé d'un système de dilution de l'alimentation en entrée de réacteur qui permet de faire varier la concentration en carbone dans l'alimentation. Le pH à l'entrée du réacteur est régulé dans le bac de dilution avec de la soude à 50 % par un régulateur intégré au pH-mètre qui actionne la pompe doseuse à partir de seuils prédéfinis.

La recirculation de l'effluent est assurée par une pompe péristaltique et s'effectue à un débit constant de 600 L.h^{-1} qui permet, dans les conditions normales d'opération, un bon

mélange du courant d'alimentation avec la phase liquide du réacteur, ainsi qu'une régulation correcte de la température. Un capteur de pH effectue la mesure sur la même boucle.

Le réacteur utilisé contient un support ordonné constitué de profilés tubulaires en PVC décrit précédemment. Ce garnissage présente un certain nombre d'avantages :

- il possède une surface spécifique élevée égale à $180 \text{ m}^2/\text{m}^3$,
- il présente un taux de vide supérieur à 95%, et il est du type " *orienté* " ce qui limite les problèmes de colmatages rencontrés avec des supports " *en vrac* " qui peuvent être observés après quelques mois de fonctionnement.

Pour les trois démarrages mis en œuvre, la CVA est augmentée par accroissement de la DCO de l'effluent et à TSH constant et égal à un jour (soit un débit de l'alimentation fixé 40 L.h^{-1}) afin de limiter au maximum l'impact de l'activité de microorganismes " *libres* " sur les performances épuratoires du réacteur et de favoriser le développement du biofilm. L'effluent industriel utilisé est composé de vinasses de distilleries diluées.

Selon la stratégie A, la concentration de l'effluent d'alimentation est augmentée par paliers successifs lorsque le rendement épuratoire atteint un seuil minimal de 80%, depuis une concentration de $1 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}$, soit une CVA en $\text{g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ initiale de $1 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ jusqu'à une concentration finale de $18 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Dans le cas de la stratégie C, la concentration de l'effluent suit une augmentation exponentielle depuis une concentration initiale de $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ soit une CVA initiale de $0,5 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ jusqu'à une concentration finale de $20 \text{ g}_{\text{DCO}}.\text{L}^{-1}.\text{j}^{-1}$:

- dans le cas du démarrage C_{11} la durée de montée en charge est fixée à 25 jours,
- dans le cas du démarrage C_{12} la durée de montée en charge est initialement fixée à 20 jours.

La durée de fonctionnement des réacteurs en mode discontinu et de recirculation de l'inoculum (phase d'inoculation) est de soixante-douze heures pour le démarrage suivant la stratégie A et vingt-quatre heures pour la stratégie C_{12} . Lors du démarrage suivant la stratégie C_{11} , le réacteur a été alimenté en continu immédiatement après l'apport de l'inoculum, la durée de la phase d'inoculation a ainsi été réduite au minimum.

III.6.2 Comparaison des stratégies A (épuration maximale) et C (montée en charge exponentielle)

III.6.2.1 Vitesse de montée en charge

La Figure III.58 trace l'évolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la montée en charge suivant la stratégie A. Trois jours après l'inoculation, l'alimentation en continu débute à une CVA de $0,6 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Les microorganismes apportés par l'inoculum, qui sont restés trois jours en contact avec le support lors de la phase d'inoculation, sont rapidement lessivés. Lors de la première semaine, le rendement épuratoire augmente rapidement pour atteindre la valeur seuil de 80%, la charge volumique est alors augmentée à $2 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Les faibles valeurs de rendement observées lors des premiers jours témoignent, comme lors des études précédentes menées sur les réacteurs à lit turbulent inverse, d'une période d'acclimatation des microorganismes à leur nouvel environnement.

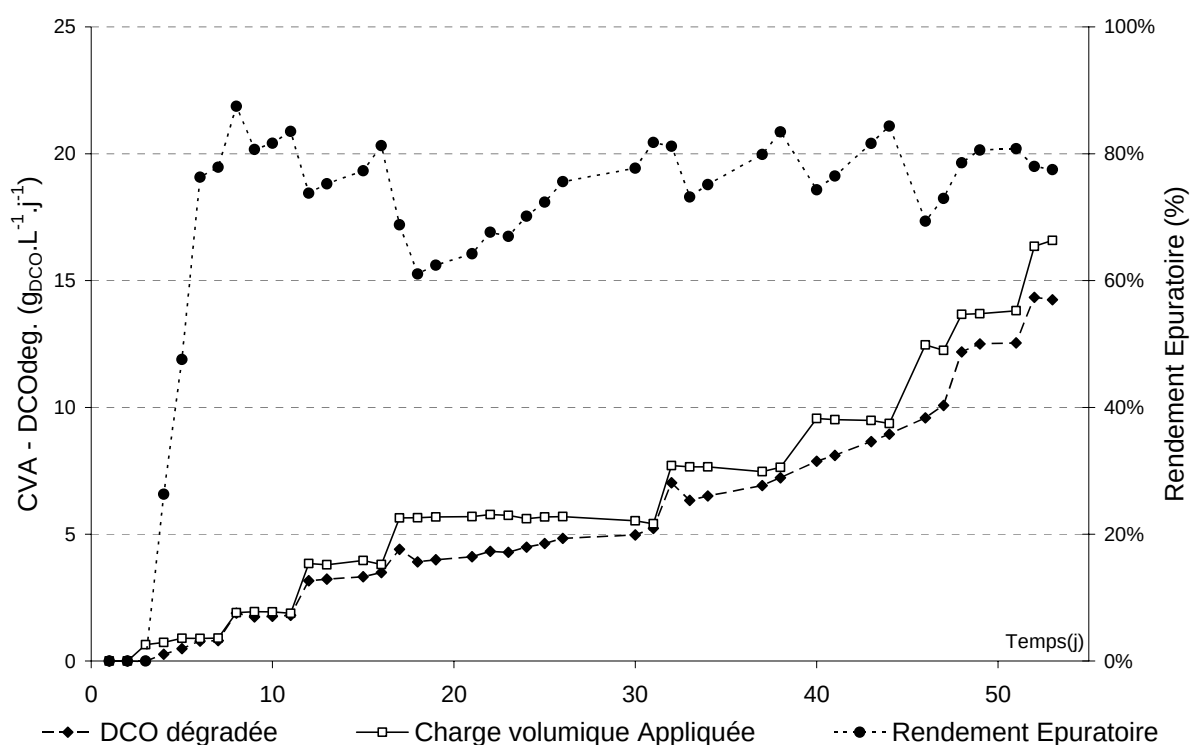


Figure III.58 : Stratégie A – Evolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage

Durant les dix-sept premiers jours la charge volumique est ainsi augmentée par paliers de 30% jusqu'à atteindre une CVA de $5,4 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Le rendement épuratoire chute alors fortement de 81% à 61%, puis augmente progressivement durant quatorze jours et ne dépasse à nouveau la valeur seuil de 80 que le 31^{ème} jour. Les paliers suivants sont plus brefs et malgré

les augmentations de charge relativement rapprochées les 32^{ème}, 40^{ème}, 45^{ème}, 48^{ème} et 52^{ème} jours, le rendement épuratoire est maintenu à des valeurs comprises entre 73% et 84%. En vingt et un jours, la CVA est donc augmentée de 5,4 à 16,6 $\text{g}_{\text{DCO}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Durant les cinquante-quatre jours de l'étude la valeur de DCO dégradée suit une augmentation quasi linéaire (Figure III.58) et la vitesse de montée en charge est en moyenne de 0,3 $\text{g}_{\text{DCOin}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Comme on peut le constater à la Figure III.59, chaque augmentation de la CVA provoque une augmentation transitoire de la concentration en acides gras volatils. Ces AGV sont ensuite progressivement dégradés au fur et à mesure de la croissance des populations méthanogènes et leur concentration ne dépasse jamais 1,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

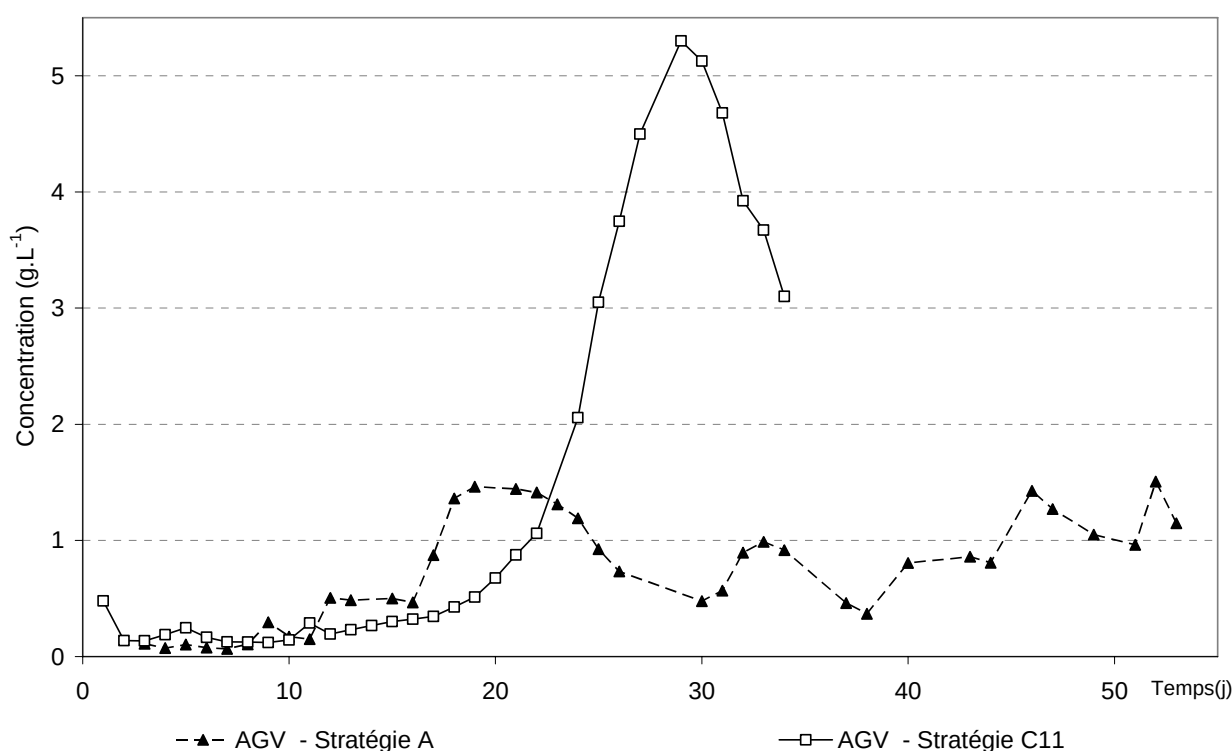


Figure III.59 : Stratégie A et C₁₁ – Evolution de la concentration en AGV totale

Dans le cas du démarrage C₁₁ (Figure III.60), la montée en charge débute le premier jour immédiatement après l'introduction dans le réacteur de l'inoculum. Lors d'une première phase, malgré une augmentation exponentielle de la CVA de 0,4 à 2 $\text{g}_{\text{DCOin}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$, le rendement épuratoire augmente progressivement pour se stabiliser autour de 80% à partir du 10^{ème} jour. Cette valeur est maintenue jusqu'au 16^{ème} jour, puis le rendement épuratoire diminue fortement et régulièrement durant toute la fin de la montée en charge. Le 25^{ème} jour, la CVA finale est atteinte, la chute du rendement épuratoire se poursuit, et atteint un minimum le 27^{ème} jour à 54%. L'accumulation d'acides gras volatils lors de cette phase de chute du

rendement, est très importante (Figure III.59) et les valeurs de concentrations (exprimées en AGV totaux) culminent le 28^{ème} jour à 5,3 g.L⁻¹. Ces AGV sont ensuite partiellement consommés et le rendement épuratoire augmente à nouveau pour atteindre 81% le 34^{ème} jour. La vitesse moyenne d'augmentation de la CVA sur la durée totale du démarrage est ici égale à 0,59 g_{DCOin}.L⁻¹.j⁻¹.

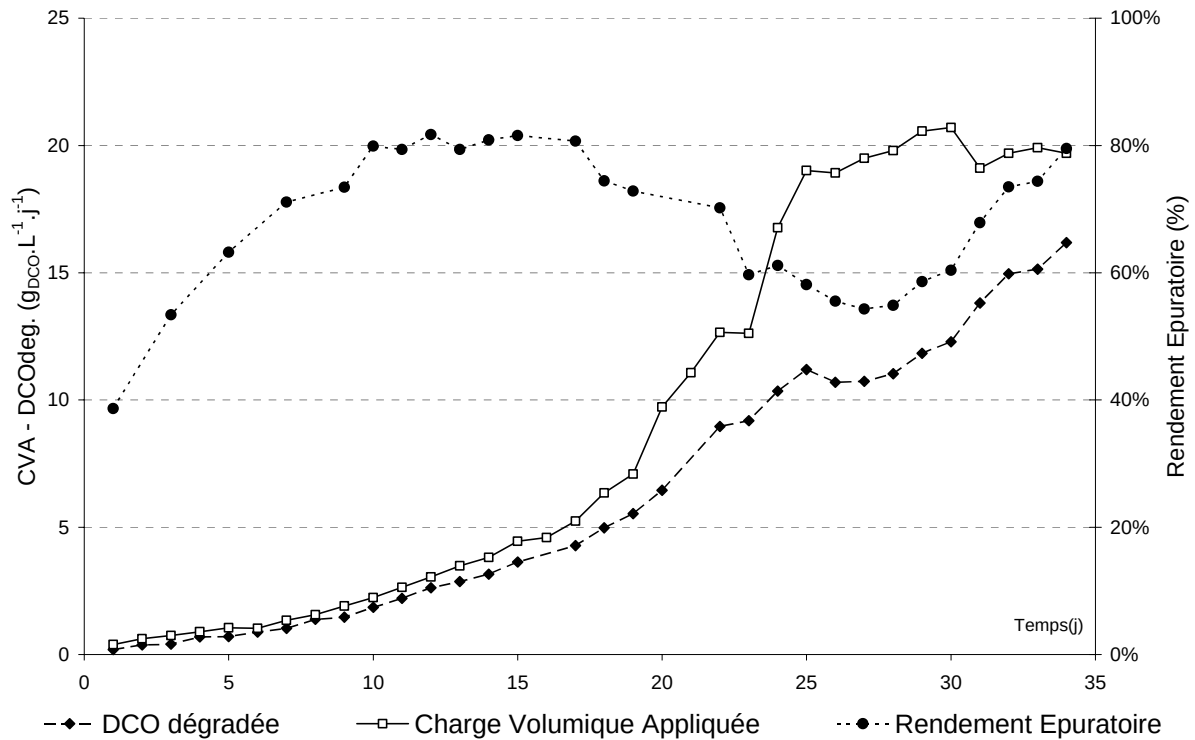


Figure III.60 : Démarrage C₁₁ – Evolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage

Ces résultats peuvent être comparés aux travaux de Ouichanpagdee et *al.* (Ouichanpagdee *et al.* 2004) réalisés avec le même type d'effluent (vinasses de distilleries), sur un réacteur similaire à lit fixe ascendant de 1m³ garni d'un support identique à celui utilisé pour cette étude, mais selon une stratégie de démarrage différente. La stratégie utilisée par Ouichanpagdee et *al.* (2004) consiste à accroître la CVA en augmentant le débit d'alimentation en vinasse non diluée (DCO constante en entrée). Cette stratégie s'apparente à la stratégie C₂ testée sur LTI lors de la phase expérimentale précédente. Toutefois, dans le cas de Ouichanpagdee et *al.* (2004), la CVA n'est pas augmentée de manière exponentielle mais en fonction du rendement épuratoire qui est maintenu supérieur à 70%. Cette approche peut donc également être apparentée à la stratégie A testée sur LTI. Ces travaux ont permis une montée en charge de 2 à 14 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ en cent quatre-vingt-quinze jours, soit une vitesse de

montée en charge de $0,07 \text{ g}_{\text{DCOin}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ nettement inférieure à celles atteintes avec les stratégies testées ici.

III.6.2.2 Activité spécifique du biofilm

Le prélèvement et l'analyse de portions de support colonisé réalisés lors des différents démarrages de ce réacteur à lit fixe permettent de mesurer les matières sèches attachées (MSA) qui représentent le biofilm total et les matières volatiles attachées (MVA) qui constituent la fraction organique du biofilm. La mesure des MVA ainsi que le suivi des matières volatiles en suspension (MVS) dans la phase liquide du réacteur ont permis de caractériser l'activité spécifique du biofilm à la fin du démarrage, dans le cas des stratégies A et C₁₁. Pour la stratégie A, le 54^{ème} jour, la biomasse fixée représente 88,1% de la biomasse totale du réacteur, et son activité spécifique est égale à $1,24 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Dans le cas de la stratégie C₁₁, le 34^{ème} jour, le biofilm représente 95,6% de la biomasse totale du réacteur et son activité spécifique est estimée à $2,59 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$. Les valeurs deux fois plus élevées sont donc mesurées dans le réacteur soumis à la stratégie C₁₁, dont la montée en charge a été plus rapide. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par Ouichanpagdee *et al.* (2004) : à la fin de la phase de démarrage, le 189^{ème} jour, la quantité de biomasse attachée est égale à $19,5 \text{ g}_{\text{MVA}} \cdot \text{L}^{-1}$, et la quantité de DCO dégradée à $11,2 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$, soit une activité spécifique beaucoup plus faible égale à $0,57 \text{ g}_{\text{DCOdeg}} \cdot \text{g}_{\text{MVA}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$.

Les activités spécifiques mesurées pour ce type de réacteur à lit fixe sont généralement proches de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Weiland *et al.* 1991). Elles sont représentatives de l'activité de biofilm dans des conditions stationnaires de fonctionnement des réacteurs. Dans cette étude, la mesure de l'activité spécifique a lieu à la fin de la phase de démarrage à partir des mesures de matières attachées réalisées sur un biofilm "jeune". Elles donnent une indication de l'activité du biofilm en phase de croissance et donc constitué de cellules nouvellement formées et majoritairement actives. De plus, la faible épaisseur de biofilm limite les problèmes de diffusion rencontrés pour des biofilms matures et plus épais et qui tendent à faire diminuer les valeurs d'activité spécifique apparente.

III.6.3 Performances des réacteurs lors de la montée en charge exponentielle

III.6.3.1 Impact de la montée en charge exponentielle sur le pH et l'alcalinité

Si la mesure du débit de biogaz produit donne une indication indirecte du rendement épuratoire, sa composition est tout aussi riche en information (Figure III.61). En effet, des phénomènes de dissolution ou de dégazage de CO_2 sont à l'origine du changement du débit de gaz mesuré sans que cela soit le reflet direct d'une modification du rendement de conversion de la DCO en biogaz. De plus, l'accroissement du pouvoir tampon qui découle de ces phénomènes de transfert de matière entre gaz et liquide a un impact crucial sur la stabilité du système.

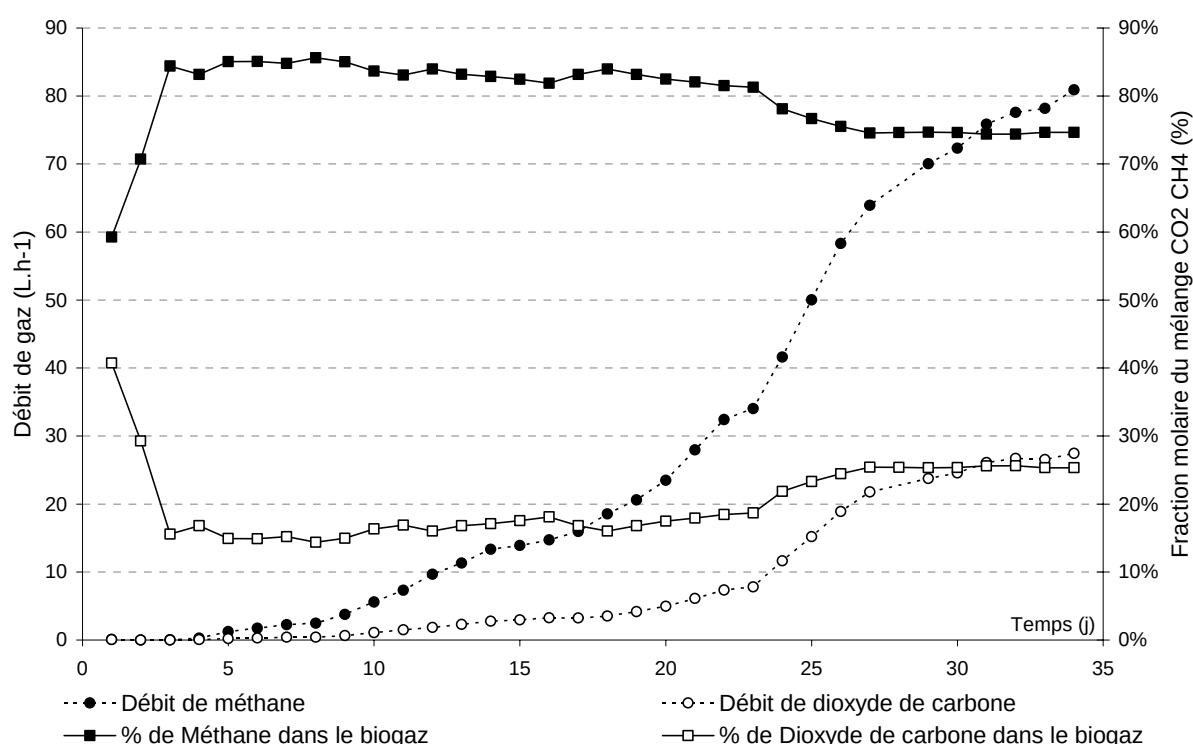


Figure III.61 : Stratégie C_{11} – Evolution du débit de production du biogaz et de sa composition en méthane et dioxyde de carbone durant la phase de démarrage

La Figure III.62 trace l'évolution des alcalinités partielle et totale, de la concentration en bicarbonates et du pH durant la phase de démarrage dans le cas de la stratégie C_{11} . La stratégie mise en œuvre qui consiste à lessiver rapidement la biomasse libre en appliquant un TSH court présente un inconvénient majeur telle que nous l'avons appliquée, la dilution de l'effluent est réalisée avec de l'eau du réseau dont le pouvoir tampon est très faible. Le taux de dilution élevé entraîne une diminution rapide de la concentration en composés à l'origine de ce pouvoir tampon (principalement les carbonates) et le faible débit de biogaz ne permet pas la solubilisation d'une quantité suffisante de dioxyde de carbone pour maintenir une

alcalinité suffisante. On assiste donc à une diminution rapide du pH durant les cinq premiers jours (Figure III.62) due à la baisse du pouvoir tampon de la phase liquide couplée à la production d'acides organiques (AGV) par les bactéries fermentaires et acidogènes. La neutralisation de l'alimentation par ajout automatique de soude dans le bac de dilution en tête de réacteur est alors nécessaire pour maintenir un pH proche de la neutralité et compatible avec la méthanogenèse. Les très faibles débits de production de dioxyde de carbone observés durant les dix premiers jours de la montée en charge témoignent donc des phénomènes de dissolution de ce gaz dans la phase liquide, accentués par l'ajout de soude dans l'alimentation. Comme on peut l'observer sur la Figure III.62, l'ajout de soude dans l'effluent d'alimentation et cette solubilisation du CO_2 entraînent une augmentation de la concentration en bicarbonate et de l'alcalinité et donc une augmentation du pH de 6,6 jusqu'à des valeurs supérieures à 7,2 à partir du 26^{ème} jour.

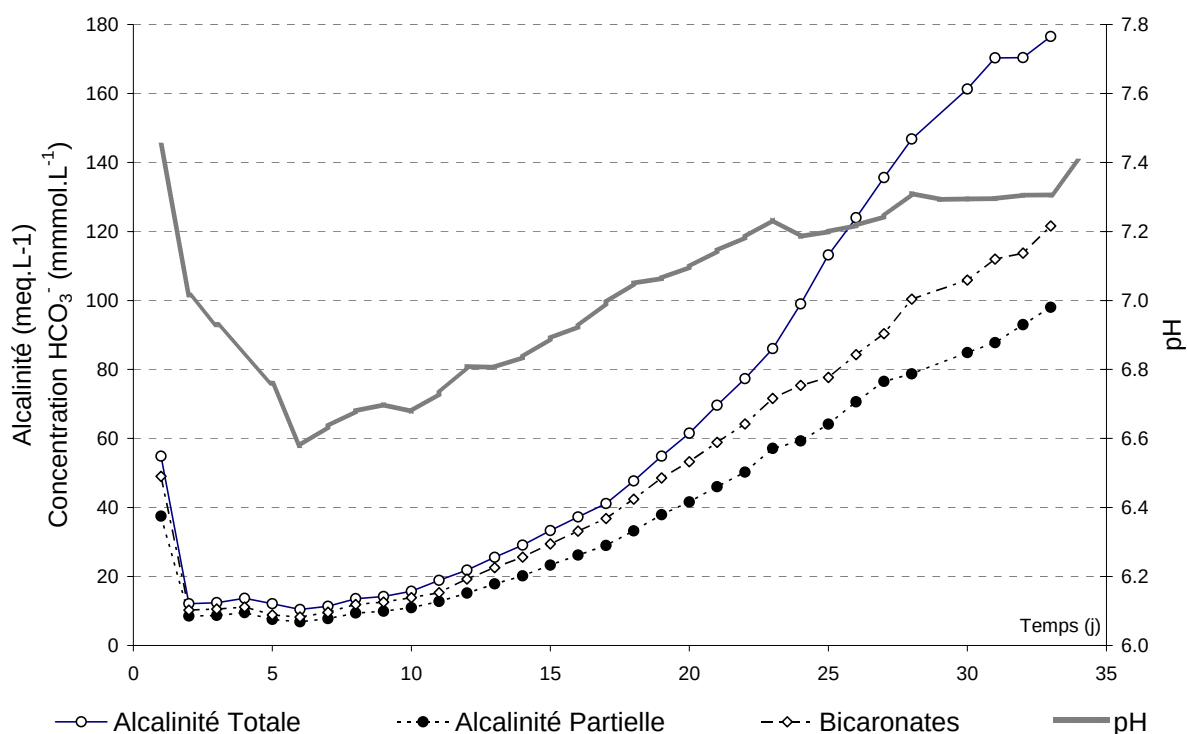


Figure III.62 : Stratégie C₁₁ - Evolution de l'alcalinité partielle, de l'alcalinité totale, de la concentration en bicarbonates et du pH durant la phase de démarrage

A partir du 23^{ème} jour, le pH de l'effluent d'alimentation n'est plus contrôlé. Comme on peut le constater sur la Figure III.61, l'arrêt de l'ajout de soude a un impact direct sur le débit de biogaz et sur sa composition, le pourcentage de CO_2 augmente ainsi de moins de 20% à plus de 25% entre les 23^{ème} et 28^{ème} jour.

Dans le cas d'une application industrielle, la réglementation interdit la dilution de l'effluent. L'application d'une telle stratégie n'est donc pas envisageable. De plus, l'ajout d'une quantité adaptée de soude dans le réacteur au moment du démarrage engendre des surcoûts dus à la mise en place d'un système de régulation automatique du pH et à la consommation non négligeable de réactif qu'elle implique (environ $1\text{ g}_{\text{NaOH}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ durant les 25 jours de la montée en charge).

En revanche, il est tout à fait envisageable de remplacer la dilution à l'eau pratiquée ici par une recirculation de l'effluent traité en tête de réacteur, ce qui pourrait permettre :

- de maintenir un pouvoir tampon élevé dans la phase liquide, l'ajout d'un composé basique ne serait alors plus nécessaire,
- de diluer l'effluent afin d'obtenir la concentration voulue tout en maintenant un temps de séjour hydraulique suffisamment court.

III.6.3.2 Influence d'une perturbation majeure sur le démarrage

La Figure III.63 présente l'évolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage dans le cadre de la stratégie C_2 .

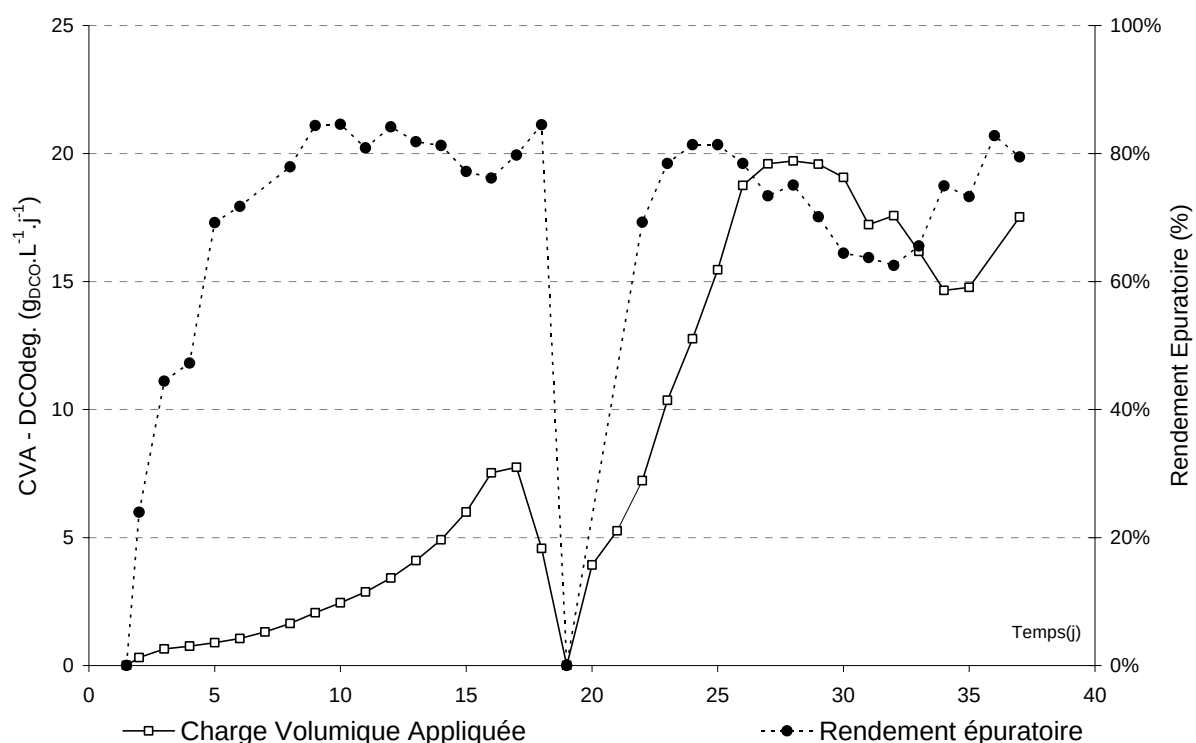


Figure III.63 : Stratégie C ou démarrage C_{12} – Evolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage

La montée en charge exponentielle initialement prévue pour durer vingt jours est interrompue le 18^{ème} jour (à une CVA égale à $7,74 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) par un incident majeur ayant entraîné la vidange complète du réacteur. Après une période de dix heures durant laquelle il est totalement vidé de sa phase liquide, le réacteur est rempli avec de l'eau. Douze heures environ après cet incident, l'alimentation en continu reprend. Une phase de ré-acclimatation d'une durée de quatre jours est alors programmée.

La CVA est progressivement augmentée afin d'obtenir des conditions opératoires (CVA et TSH) équivalentes à celles qui auraient dû être atteintes le jour suivant la perturbation. Durant cette phase, la DCO de l'alimentation est maintenue à une valeur constante de $11,5 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1}$; le débit d'alimentation est augmenté (de $14 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ à $39 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$) afin de favoriser l'augmentation rapide de l'alcalinité en limitant la dilution. Le rendement épuratoire augmente à nouveau pour atteindre des valeurs proches de 80% le 23^{ème} jour. Les conditions opératoires sont alors équivalentes à celles qui auraient dû être obtenues le 20^{ème} jour si aucun problème technique n'était survenu (*i.e.* une CVA égale à $10,4 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$). La montée en charge reprend alors selon la stratégie C₂, la concentration de l'alimentation en DCO est donc augmentée de manière exponentielle en cinq jours, et la CVA augmente en conséquence depuis $10,44 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ à $19,64 \text{ g}_{\text{DCO}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ le 27^{ème} jour. Le rendement relativement stable durant cette période de montée en charge chute à partir du 28^{ème} jusqu'au 32^{ème} jour puis augmente à nouveau.

Les variations de la CVA observées à partir du 30^{ème} jour sont dues à l'instabilité du débit d'alimentation qui fait l'objet d'un contrôle automatique en fonction du pH, ceci afin d'éviter tout phénomène de surcharge organique. Durant toute la phase de montée en charge, comme dans le cas de la stratégie C₁, le pH de l'alimentation est régulé par ajout automatique de soude dans le bac de dilution en amont du réacteur afin de favoriser la mise en place d'un pouvoir tampon suffisant. Le pH du réacteur est ainsi artificiellement maintenu au-dessus du seuil de régulation du débit d'alimentation (6,8). A partir de la fin de la montée en charge (28^{ème} jour), le pH de l'effluent d'alimentation n'est plus contrôlé, la production d'acides organiques entraîne alors la baisse du pH dont les valeurs franchissent le seuil de régulation, ce qui entraîne une diminution temporaire du débit d'alimentation (Figure III.64). Cette relative instabilité du pH témoigne des faibles valeurs d'alcalinité atteintes à la fin de la montée en charge (Figure III.64).

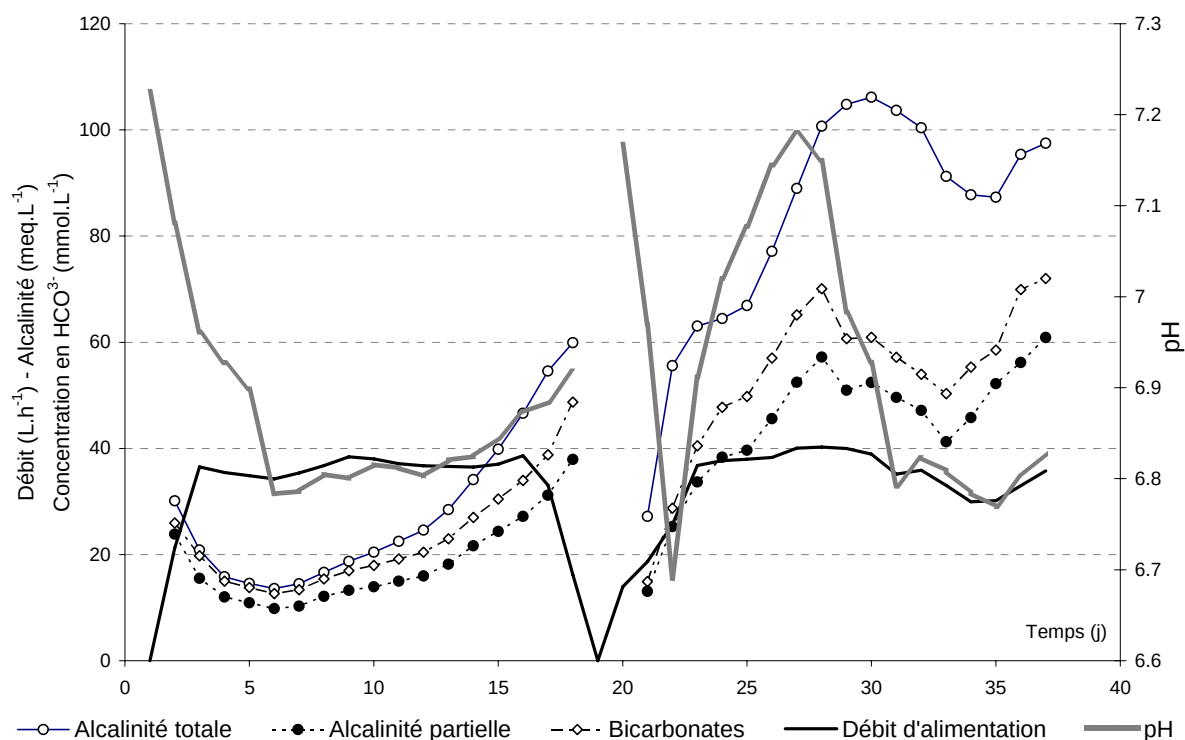


Figure III.64 : StratégieC₁₂ – Evolution des alcalinités partielle et totale, de la concentration en bicarbonates, du pH et du débit d'alimentation durant la phase de démarrage

En effet, la vidange de la totalité de la phase liquide le 18^{ème} jour et la remise en eau du réacteur n'ont pas permis d'obtenir des valeurs d'alcalinité suffisantes (comme c'est le cas pour le réacteur C₁) pour tamponner l'acidité induite par la forte production d'AGV à la fin de la montée en charge. La baisse temporaire du débit d'alimentation, et par conséquent de la CVA, permet une consommation du surplus d'AGV produits et une augmentation de l'alcalinité. Une fois ces AGV consommés, le pH augmente à nouveau et le débit d'alimentation est restauré automatiquement à sa valeur nominale. Le 37^{ème} et dernier jour de l'étude, la charge volumique appliquée est égale à 17,5 g_{DCO}.L⁻¹.j⁻¹ et le rendement épuratoire à 79%.

III.6.4 Développement du biofilm

Le réacteur à lit fixe utilisé dans cette étude étant en fonctionnement avec le même type d'effluents industriels depuis plusieurs années, nous présentons ici les tendances sur le développement à long terme du biofilm.

Les mesures de biomasse attachée permettent de tracer l'évolution de la colonisation du support par le biofilm sur huit mois telle quelle est représentée à la Figure III.65. On constate une augmentation de la proportion de matières minérales lors de la maturation du biofilm. Les MVA qui constituent près de 87% de la masse du biofilm sec après les trente-

quatre jours de démarrage dans le cas de la stratégie C₁₁, ne représentent plus que 50% des matières attachées après huit mois de fonctionnement. Cette évolution traduit une tendance du biofilm à la minéralisation. La fraction minérale est par définition une partie non active du biofilm dans les processus de dégradation de la matière organique, son augmentation a pour effet de diminuer l'activité spécifique de la biomasse fixée et n'est donc pas souhaitable. Ce phénomène de minéralisation couplé à la croissance du biofilm en épaisseur entraîne la diminution du volume liquide de ce type de réacteur et s'achève *in fine* par le colmatage du lit.

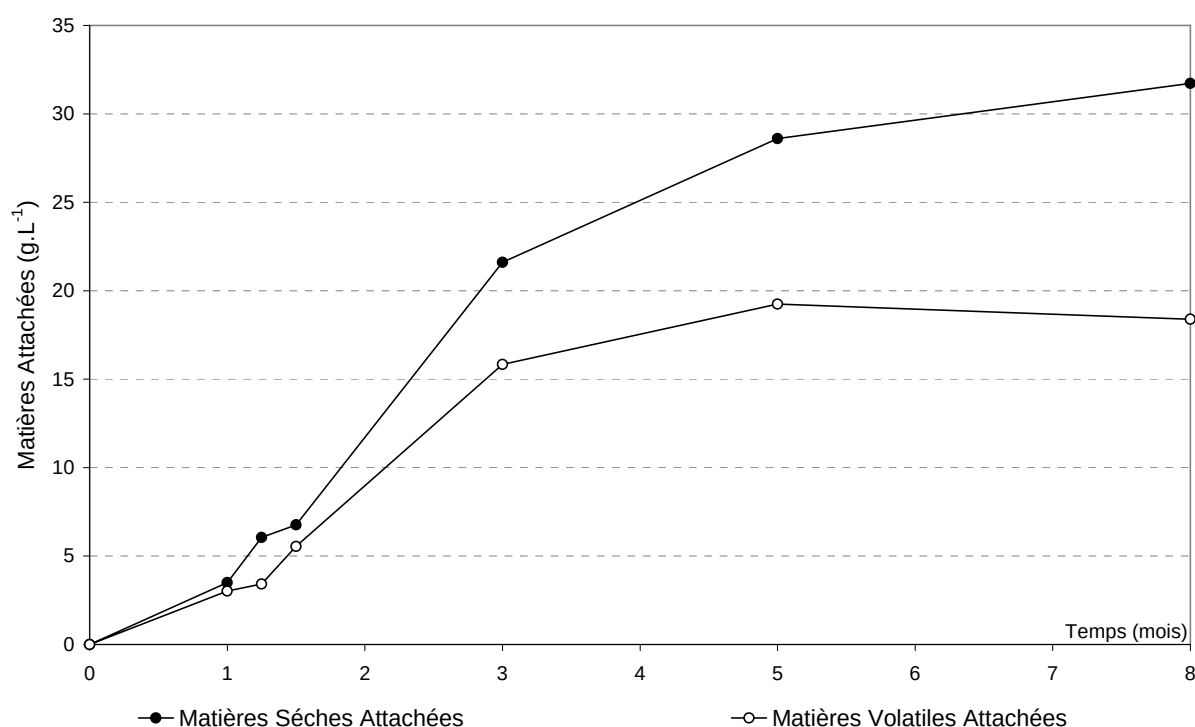


Figure III.65 : Evolution des matières sèches attachées (MSA) et des matières volatiles attachées (MVA) mesurées après plusieurs démarrages réalisés selon différentes stratégies

Ce phénomène a pu être observé sur ce même réacteur traitant également des vinasses de distilleries après une période de fonctionnement de sept ans. Une étude hydrodynamique (traçage et détermination du temps de séjour) ainsi que des analyses réalisées sur le support colonisé et la mesure du volume d'eau présent dans le réacteur ont permis de caractériser le procédé (Escudié et al. 2005). Après sept ans de fonctionnement, la quantité de biomasse humide est proche de 869kg soit une concentration en biomasse fixée égale à 886,7 g.L⁻¹, et son volume est de 718 L environ. La densité du biofilm est de l'ordre de 1.2. Le volume du liquide mobile dans le réacteur est compris entre 220 et 240 L suivant le type de mesure. La biomasse occupe donc plus de 70% du volume du réacteur, comme on peut le voir à la Figure

III.66 les canaux du support sont majoritairement colmatés rendant ainsi le réacteur in-opérationnel.

Les mesures réalisées après séchage à l'étuve montrent que le biofilm possède une humidité de 66% (soit 570 litres). Le traçage a montré que seuls 160 litres de liquide du biofilm sont accessibles par le substrat. Les MVA constituent alors près de 50% de la masse du biofilm sec, soit un pourcentage comparable à celui observé après seulement huit mois de fonctionnement.

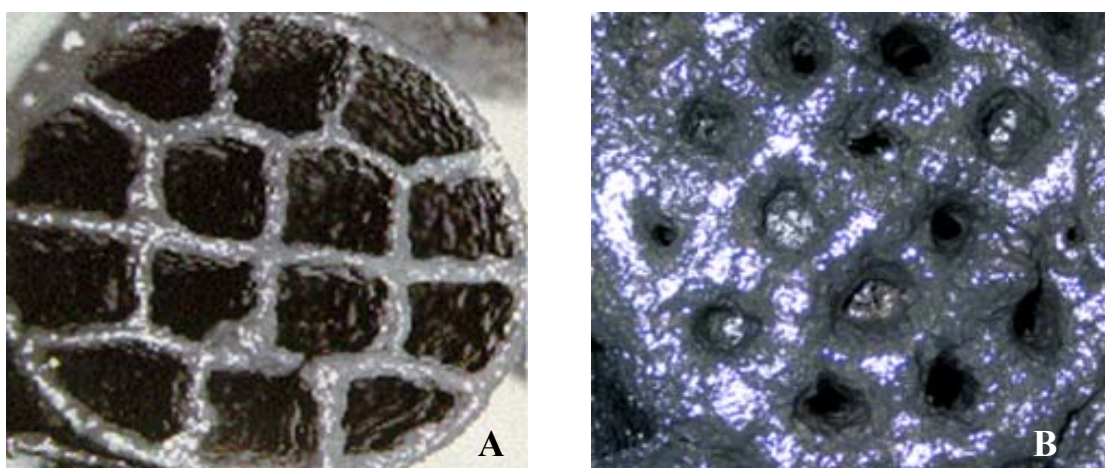


Figure III.66 : Support colonisé prélevé sur le réacteur à lit fixe ascendant après 54 jours (A) et après 7 ans de fonctionnement (B)

Durant leur étude, Ouichanpagdee *et al.* (2004) constatent une très faible croissance du biofilm lors des premières phases de la montée en charge (Figure III.67). La quantité de biomasse attachée augmente lentement, les premières mesures de MSA réalisées le 12^{ème} et le 16^{ème} jour donnent des valeurs de 0,16 g_{MSA}.L⁻¹. Après trente-trois jours, la quantité de biomasse fixée est égale à 0,66 g_{MSA}.L⁻¹, et à 2 g_{MSA}.L⁻¹ après soixante jours de fonctionnement. Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que celles obtenues avec la stratégie A après cinquante-cinq jours de fonctionnement, soit, 6,6 g_{MSA}.L⁻¹, et pour la stratégie C après trente-cinq jours, soit 3,5 g_{MSA}.L⁻¹. Ceci est dû au TSH élevé durant les premiers paliers de montée en charge qui favorise le maintien et donc la croissance des microorganismes en suspension dans la phase liquide. La compétition entre bactéries libres et bactéries fixées est favorable à la croissance des bactéries libres lorsque, comme c'est le cas ici, le TSH appliqué demeure supérieur à leur temps de doublement et occasionne le retard de colonisation constaté. Ces résultats confirment les observations réalisées lors de l'étude menée sur le démarrage des LTI.

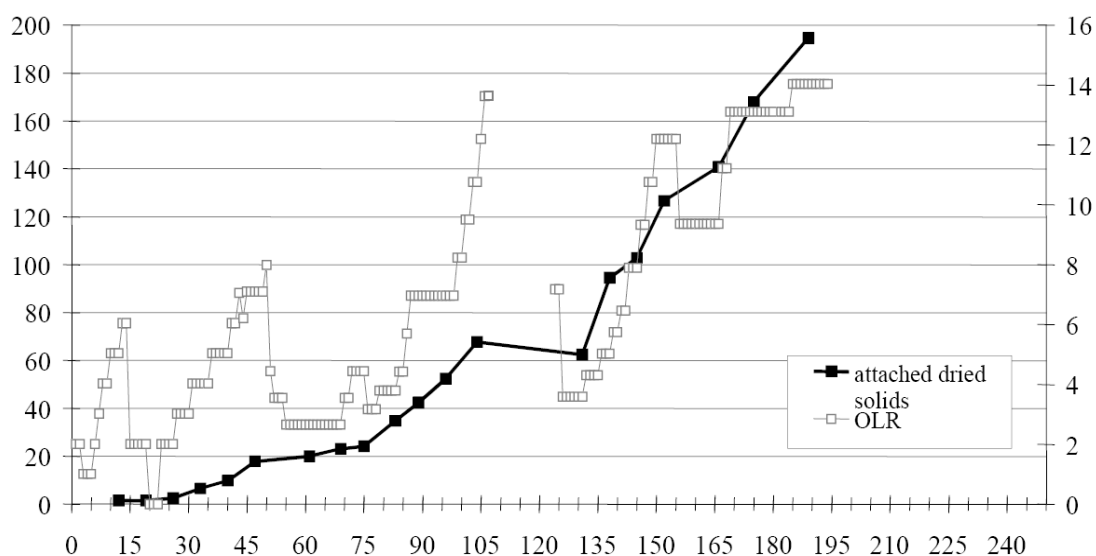


Figure III.67 : Travaux de Ouichanpagdee et *al.* (2004) – Evolution des MSA et de la CVA lors du démarrage d'un digesteur à lit fixe ascendant alimenté avec des vinasses de distilleries

La quantité de biomasse retenue dans le réacteur à lit fixe dans le cas de la stratégie C₁₁ après trente-cinq jours de fonctionnement est égale 3,1 g_{MVA}.L⁻¹. Elle est donc nettement inférieure aux mesures de MVA effectuées à la fin de la phase de démarrage du LTI réalisé selon la même stratégie (R_C), soit 10,7 g_{MVA}.L⁻¹ après quarante-trois jours de fonctionnement. La même constatation peut être faite dans le cas de la stratégie A. Dans le cas du réacteur à lit fixe, 3,42 g_{MVA}.L⁻¹ sont retenus sur le support contre presque 7 g_{MVA}.L⁻¹ à CVA équivalente et après soixante-dix jours de fonctionnement dans le cas du LTI (R_A).

Cette rétention d'une quantité plus importante de biomasse dans le cas des LTI est vraisemblablement due à la surface spécifique disponible très élevée développée par le support particulaire mobile. En effet, malgré un taux de remplissage solide de seulement 24%, la surface spécifique disponible pour la formation potentielle du biofilm est égale à 4,25 m².L⁻¹, contre 0,18 m².L⁻¹ dans le cas du lit fixe.

III.6.5 Conclusions

Les deux stratégies testées (stratégies A et C) sur le réacteur à lit fixe permettent l'augmentation rapide de la CVA, la stratégie A présentant cependant de meilleures performances en terme de vitesse de montée en charge. Elles nécessitent la mise en place d'un système de régulation du pH par ajout de soude destiné à tamponner l'acidité causée par

l'augmentation de la concentration en AGV et à compenser la baisse de l'alcalinité due au taux de dilution élevé. Cet inconvénient devrait pouvoir être évité en remplaçant la dilution à l'eau de l'effluent par une recirculation de l'effluent de sortie en tête de réacteur.

L'accumulation de biomasse sur le support, recherchée pendant la période de démarrage, se poursuit durant toute la période de fonctionnement du procédé. Elle se traduit alors par une baisse de l'activité spécifique, une forte minéralisation et à terme des phénomènes de colmatage. Ce biofilm confère une robustesse certaine au procédé, lui permettant de supporter des perturbations importantes telles qu'une vidange complète et une mise à l'air pendant une douzaine d'heures pendant la phase de démarrage.

Les résultats obtenus lors des études menées sur les LTI ont été confirmés lors de cette étude sur un pilote de 1 m³ et démontrent l'applicabilité des stratégies mises au point sur des digesteurs industriels.

Conclusions générales et perspectives

Cette thèse avait pour ambition de contribuer à la compréhension des mécanismes de mise en place des biofilms dans les procédés de dépollution anaérobie à biomasse fixée. Grâce aux outils du génie des procédés et de la microbiologie moléculaire, nous avons pu évaluer l'influence de plusieurs paramètres jouant un rôle déterminant lors des phases d'inoculation et de montée en charge des digesteurs, permettant ainsi d'optimiser leur démarrage.

L'étude de l'étape d'inoculation a permis de mieux comprendre les différentes phases de fixation de la biomasse. L'utilisation de la PCR-SSCP a conduit à la détection des populations microbiennes adhérant de façon précoce lors des phases initiales de formation du biofilm. L'hypothèse d'une fixation rapide des microorganismes lors du contact initial entre les cellules libres et le support vierge, en nombre suffisant pour former un biofilm implique la possibilité de réduire la durée de la phase d'inoculation. Cette hypothèse a pu être testée avec succès lors des démarrages de différents digesteurs réalisés au cours de cette étude. Ainsi, la durée de la phase d'inoculation en mode discontinu (batch) a été successivement réduite à 48 heures lors de l'étude de l'influence des contraintes hydrodynamiques, puis à 12 heures dans le cas de la comparaison des stratégies de l'épuration maximale et de la charge maximale en LTI. Cette phase d'inoculation en mode discontinu a enfin été simplement réduite au temps de remplissage du réacteur (quelques minutes pour le LTI et environ une heure pour le LF) lors des montées en charge exponentielles, les réacteurs ont été opérés en mode continu immédiatement après l'apport de l'inoculum. Concernant la durée de la phase de démarrage, la mise en évidence de cette fixation précoce et non spécifique des microorganismes au support, a donc conduit à la réduction de la durée de la phase d'inoculation, habituellement de quelques jours, voir plusieurs semaines dans certains cas, à seulement quelques heures.

Au cours de cette étude, nous avons également pu démontrer l'importance cruciale de la composition du milieu en éléments traces métalliques pour le processus de méthanogenèse. L'impact négatif du déficit en cobalt et en nickel sur la croissance et sur l'activité méthanogène du biofilm a toutefois pu être surmontée grâce à une complémentation du milieu adaptée, rétablissant rapidement (en quelques jours) et durablement une activité méthanogène acétoclaste optimale et non limitante ainsi que la croissance du biofilm.

Une étude microbiologique du biofilm durant la phase de démarrage a permis d'établir certaines relations entre la biodiversité, la dynamique des populations et les performances des réacteurs. Une approche métabolique de reconstruction basée sur l'identification des

microorganismes majoritaires, en relation avec le suivi opérationnel des LTI, a montré un lien fort entre biodiversité et stabilité fonctionnelle des écosystèmes. Cette étude moléculaire a également illustré l'importance du choix d'un inoculum adapté, qui détermine la nature des espèces microbiennes présentes dans le biofilm et va influencer la vitesse de montée en charge et les performances des bioréacteurs lors de leur démarrage. L'utilisation de techniques d'investigation *in situ* (FISH et microscopie confocale) a également révélé l'organisation spatiale du biofilm, montrant une répartition homogène des populations *Archaea* et bactérienne, vraisemblablement dictée par les phénomènes de diffusion et d'accès au substrat.

Nous avons ensuite étudié l'impact des conditions hydrodynamiques sur la formation du biofilm dans les LTI. Pour ce type de réacteurs triphasiques, fluidisés par injection de gaz, l'attrition (chocs entre particules) proportionnelle à la vitesse du gaz est supposée être la principale contrainte agissant sur la mise en place du biofilm. Grâce à une étude comparative effectuée lors du démarrage de deux LTI soumis à des vitesses de gaz différentes, nous avons pu mettre en évidence que les contraintes hydrodynamiques conditionnent effectivement la mise en place et le développement du biofilm sur le support. Une vitesse de gaz élevée (10mm.s^{-1}) est à l'origine de la formation d'un biofilm fin et actif mais retarde l'accumulation de biomasse au point de ralentir le démarrage. A l'inverse, minimiser la vitesse du gaz (vitesse limite de fluidisation) a pour conséquence une accumulation de biomasse plus rapide et une meilleure stabilité opérationnelle du réacteur. Une fois un régime stationnaire atteint et le biofilm arrivé à maturité, l'étude des conséquences sur le biofilm d'une variation de la vitesse du gaz a établi la possibilité de contrôler les taux de détachement et d'accumulation de biomasse, par l'ajustement des contraintes hydrodynamiques. Concernant la problématique du démarrage, il est donc préférable dans un premier temps, durant la phase de montée en charge, d'appliquer des contraintes hydrodynamiques faibles afin de faciliter le développement rapide du biofilm. Dans un second temps, lorsqu'une quantité suffisante de biomasse est accumulée sur le support, il peut être souhaitable d'augmenter ces contraintes afin de contrôler l'épaisseur du biofilm, d'augmenter son activité spécifique et d'optimiser les performances du réacteur.

Lors d'une première phase expérimentale, nous avons comparé différentes stratégies de montée en charge pour le démarrage des LTI.

La comparaison des stratégies de montée en charge par accroissement exponentiel de la concentration en carbone organique de l'effluent ou du débit d'alimentation a illustré les phénomènes de compétition entre les microorganismes libres et fixés. Cette étude a souligné l'importance du temps de séjour hydraulique dans cette compétition. Un lessivage rapide de la biomasse libre et le maintien d'un taux de dilution élevé limitent le développement des microorganismes dans la phase liquide, et favorisent fortement la croissance du biofilm. En terme de performances, le rendement épuratoire est globalement plus élevé et la quantité de carbone organique converti en biogaz plus importante. Cette stratégie de montée en charge exponentielle à temps de séjour hydraulique court a permis un démarrage très rapide des LTI à partir d'un support vierge, malgré les conditions hydrodynamiques contraignantes régnant dans ce type de réacteurs. Elle nécessite cependant une définition *a priori* de la durée du démarrage.

L'étude comparative des stratégies de la charge maximale et de l'épuration maximale a illustré l'intérêt de développer un contrôle de la montée en charge adapté à la capacité épuratoire des microorganismes. La stratégie de la charge maximale, basée sur l'analyse dynamique de la réponse du consortium méthanogène soumis à une brève augmentation de la CVA, bien qu'elle ait montré ses limites dans plusieurs cas de figure (en particulier en cas de carence nutritionnelle), a établi la possibilité de contrôler le démarrage des LTI en se basant sur la mesure du débit de biogaz produit.

Lors d'une seconde phase expérimentale, les stratégies mises au point à l'échelle des LTI sur un effluent modèle ont été testées pour le démarrage d'un réacteur semi-industriel (1m^3) alimenté avec un effluent réel (vinasses de distillerie). Les résultats obtenus ont confirmé la pertinence des stratégies testées pour le démarrage des digesteurs industriels ainsi qu'une certaine robustesse du procédé. La montée en charge exponentielle appliquée au LF a ainsi permis une augmentation de la charge en 25 jours à des valeurs supérieures à $20\text{ kg}_{\text{DCO}}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{j}^{-1}$, tout en maintenant un rendement épuratoire élevé ainsi qu'une croissance importante du biofilm. Malgré l'utilisation d'un support présentant un fort taux de vide, le suivi à long terme de la colonisation du digesteur à LF a illustré la tendance à la minéralisation du biofilm et à l'accumulation de biomasse jusqu'au colmatage. Ce désagrément majeur, caractéristique des procédés à support fixe, est évité dans le cas des LTI en raison du maintien d'un taux de détachement élevé du biofilm et leur confère un avantage significatif. En effet, la capacité de rétention de biomasse est une caractéristique cruciale pour

les réacteurs intensifs, puisqu'elle conditionne la quantité de pollution qui peut être traitée. La forte capacité de rétention de biomasse observée dans les LTI pour les supports de type particulaire à faible diamètre (192µm dans le cas du support étudié) et présentant des surfaces spécifiques élevées, associée à la possibilité de contrôler la croissance du biofilm en modulant les contraintes hydrodynamiques, laisse présager des potentialités accrues pour ce type de réacteur en terme de charge volumique traitée et d'intensification des procédés de traitement anaérobie.

Grâce à une approche largement pluridisciplinaire, les données recueillies lors de cette thèse contribuent à une meilleure compréhension des phénomènes biologiques mis en jeu lors du démarrage des digesteurs anaérobies à biomasse fixée. Sur le plan applicatif, l'étude de l'impact des conditions opératoires sur la mise en place et le développement du biofilm a permis la mise au point d'une stratégie pour un démarrage rapide des réacteurs à partir d'un support vierge, applicable pour des installations industrielles.

Perspectives

De nombreuses pistes identifiées durant cette thèse peuvent être exploitées afin d'optimiser encore la phase de démarrage de ces réacteurs anaérobies à biomasse fixée.

Une analyse approfondie de la phase d'inoculation devrait permettre d'améliorer encore cette étape cruciale. Dans cette optique, une étude de la physico-chimie des matériaux portant sur la caractérisation du support couplée à une approche microbiologique grâce aux méthodes moléculaires, pourrait permettre de mieux caractériser les interactions entre les cellules libres et la surface lors du contact initial. Les connaissances fondamentales sur les phénomènes passifs et actifs à l'origine de l'adhésion précoce pourraient aboutir à la sélection de matériaux dont les propriétés physiques (rugosité, porosité, nature chimique des surfaces) faciliteraient l'adhésion des microorganismes anaérobies.

L'identification des microorganismes se fixant de manière irréversible et l'étude de leurs caractéristiques morphologiques ou génétiques pourraient permettre d'identifier les facteurs biologiques responsables de leur adhésion préférentielle au support. Les mécanismes de reconnaissance de la surface par les micro-organismes, de fixation, de production des EPS, l'influence des conditions externes (hydrodynamique, chimie du milieu...), du support (solide, interface, état de surface, propriétés de surface...), la participation du film

conditionnant (molécules organiques, protéines...) sont autant de pistes à approfondir. La compréhension des mécanismes de bioadhésion est indispensable pour améliorer la fixation des microorganismes. Il est envisageable de concevoir de nouveaux matériaux ou revêtements, des traitements de surface, pour favoriser la colonisation par les cellules.

La mise en place de réacteurs à lit turbulé inverse à plus grande échelle pour le traitement d'effluents réels pourrait également être accomplie. Elle passe par l'identification d'un support plus facilement utilisable industriellement que celui utilisé dans nos travaux. Outre le travail important à réaliser concernant la sélection des matériaux composant le support, il apparaît également nécessaire d'optimiser les paramètres de forme du support (par exemple maximiser la surface colonisable du support, qui représente la surface non exposée à l'abrasion). Des travaux en cours, faisant suite à cette thèse, démontrent que les supports existants sont mal adaptés à ce type de procédé ou/et à la fixation des microorganismes anaérobies.

D'une manière générale, les analyses pertinentes doivent obligatoirement être réalisées *in situ*. L'utilisation généralisée de la microscopie confocale à balayage laser ou des techniques de micromanipulations associées à l'utilisation de microcapteurs devrait permettre d'aborder cette problématique, notamment grâce au couplage avec les outils de la biologie moléculaire (techniques FISH, SSCP, marqueurs de viabilité cellulaires).

Dans un domaine aussi complexe, il est prévisible que l'accroissement des connaissances fondamentales sera inévitablement couplé à l'élaboration de modèles théoriques. Le développement et l'optimisation de modèles numériques capables d'intégrer et d'exploiter les connaissances fondamentales seront des objectifs à soutenir aussi bien pour la conception d'outils de recherche que pour la réalisation de systèmes de diagnostic et de contrôle des bioprocédés.

Dans cette optique, les données obtenues lors de ces différents démarrages font actuellement l'objet d'un travail de modélisation. L'application des modèles de digestion anaérobie AMOCO (Dochain *et al.* 2000) et ADM1 (IWA 2002) devrait apporter un éclairage nouveau sur les mécanismes impliqués lors de la mise en place des biofilms anaérobies lors du démarrage des digesteurs. L'estimation des paramètres tels que les taux de croissance et les constantes cinétiques des réactions mises en jeu par les différentes populations concernées devrait permettre de mieux évaluer l'impact de la compétition entre biomasse libre et

biomasse fixée. De même, l'apport des nombreuses données expérimentales recueillies devrait permettre d'améliorer le modèle ADM1.

Références bibliographiques

- Aivasidis, A. et C. Wandrey (1988). " Recent developments in process and reactor design for anaerobic wastewater treatment." *Water Science and Technology* **20** (1): 211-218.
- Alison, D. G. (2002). Molecular architecture of the biofilm matrix. biofilm in industry, medicine & environmental biotechnology, h.-l. s. c. European commission, National university of Ireland, Galway (Ireland).
- Alves, M., A. Pereira, M. Mota, J. M. Novais et E. Colleran (1998). " Staged and Non-staged Anaerobic Filters: Microbial Activity Segregation, Hydrodynamic Behaviour and Performance." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **73**: 99 - 108.
- Alves, M. M., M. A. Pereira, J. M. Novais, F. Fernandez Polanco et M. Mota (1999). " A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium." *Water Environment Research* **71** (2): 209-217.
- Amann, R. I., W. Ludwig et K. H. Schleifer (1995). " Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." *Microbiological Reviews* **59** (1): 143-169.
- Annachhatre, A. P. et S. M. R. Bhamidimar (1992). " Microbial attachment and growth in fixed film reactors: process startup considerations." *Biotech. Adv.* **10**: 69-91.
- Apilánez, I., A. Gutiérrez et M. Díaz (1998). " Effect of surface materials on initial biofilm development." *Bioresource Technology* **66** (3): 225-230.
- Araki, N. et H. Harada (1994). " Population dynamics of methanogenic biofilm consortium during a start-up period of anaerobic fluidized bed reactor." *Water Science and Technology* **29** (10-11): 361-368.
- Araujo, J. C., G. Brucha, J. R. Campos et R. F. Vazoller (2000). " Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy." *Water Science and Technology* **41** (12): 69-77.
- Archer, D. B. et B. H. Kirsop (1990). The microbiology and control of anaerobic digestion. Anaerobic Digestion, A Waste Treatment Technology. A. Wheatley. London, Elsevier: 43-91.

- Arnaiz, C., P. Buffière, S. Elmaleh, J. Lebrato et R. Moletta (2003). " Anaerobic digestion of dairy wastewater by inverse fluidization: the inverse fluidized bed and the inverse turbulent bed reactors." *Environmental Technology* **24**: 1431-1443.
- Arnaiz, C., S. Elmaleh, J. Lebrato et R. Moletta (2005). " Start up of an anaerobic inverse turbulent bed reactor fed with wine distillery wastewater using pre-colonised bioparticles." *Water Science and Technology* **51** (1): 153-158.
- Austermann-Haun, U. et K.-H. Rosenwinkel (1997). " Two examples of anaerobic pre-treatment of wastewater in the beverage industry." *Water Science and Technology* **36** (2-3): 311-319.
- Azbar, N., P. Ursillo et R. E. Speece (2001). " Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic process." *Water res.* **35** (3): 817-829.
- Bachmann, A., V. L. Beard et P. L. McCarty (1985). " Performance characteristics of the anaerobic baffled reactor." *Water Research* **19** (1): 99-106.
- Balaguer, M. D., M. T. Vicent et J. M. Paris (1997). " A comparison of different support materials in anaerobic fluidized bed reactors for the treatment of vinasses." *Environmental Technology* **18**: 539-544.
- Barber, W. P. et D. C. Stuckey (1998). " The influence of start-up strategies on the performance of an anaerobic baffled reactor." *Environmental Technology* **19** (489-501).
- Barber, W. P. et D. C. Stuckey (1999). " The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review." *Water Research* **33** (7): 1559-1578.
- Barber, W. P. et D. C. Stuckey (1999). " The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: A review." *Water Research* **33** (7): 1559.
- Barton, L. L. et A. F. Tomei (1995). Characteristics and Activities of sulfate-reducing bacteria. *Sulfate-Reducing Bacteria*. L. L. Barton. New York and London: 1-32.
- Batstone, D. J. (1999). High Rate Anaerobic Treatment of Complex Wastewater. B. Chemical Engineering (Hons), University of Queensland: 202.
- Batstone, D. J. et J. Keller (2001). " Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type." *Water Research* **35** (7): 1723-1729.
- Batstone, D. J., J. Keller et L. L. Blackall (2004). " The influence of substrate kinetics on the microbial community structure in granular anaerobic biomass." *Water Research* **38**: 1390-1404.
- Berne, F. et Y. Richard (1989). *Memento technique de l'eau*. Degrémont, Paris, Technique et Documentation, 1459.

- Bernet, N. et E. Paul (2006). Application of biological treatment systems for food-processing wastewaters. Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles and Applications. IWA. London, IWA Publishing: Sous presse.
- Bhattacharya, S. K., R. L. Madura, V. Uberoi et M. R. Haghighi-podeh (1995). " Toxic effects of cadmium on methanogenic systems." *Water Research* **29** (10): 2339-2345.
- Bhattacharya, S. K. et G. F. Parkin (1989). " The effects of ammonia on methane fermentation processes." *Journal of the Water Pollution Control Federation* **61** (1): 55-59.
- Bhattacharya, S. K., M. Qu et R. L. Madura (1996). " Effects of nitrobenzene and zinc on acetate utilizing methanogens." *Water Research* **30** (12): 3099-3105.
- Biebl, H., H. Schwab-Hanisch, C. Sproer et H. Lunsdorf (2000). " Propionispora vibrioides, nov gen., nov sp., a new gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols." *Archives of Microbiology* **174** (4): 239-247.
- Boone, D. R. et M. P. Bryant (1980). " Propionate-degrading bacterium Syntrophobacter wolinii sp. Nov., gen. Nov., from methanogenic ecosystems." *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 626-632.
- Bordeau, B. (2004). Le marché de la méthanisation en France - Hypothèses d'évolution à 5 et 10 ans. AND International, Gaz de France - ADEME: 11.
- Borja, R., A. Martin, M. Luque et V. Alonso (1994). " Kinetics of methane production from wine distillery wastewater in an immobilised cell bioreactor using sepiolite as support medium." *Resources, Conservation and Recycling* **10**: 317-327.
- Bornstein, B. et H. Barker (1948). " The energy metabolism of Clostridium kluyveri and the synthesis of fatty acids." *J. Biol. Chem.* (172): 659-669.
- Bos, R., H. C. Van der Mei et H. J. Busscher (1999). " Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study." *FEMS Microbiology Reviews* **23** (2): 179.
- Braun, M., F. Mayer et G. Gottschalk (1981). " Clostridium aceticum (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide." *Arch. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **128**: 288-293.
- Brito, A. G. et L. F. Melo (1999). " Mass Transfer Coefficient Within Anaerobic Biofilms: Effects Of External Liquid Velocity." *Water Research* **33** (17): 3673-3678.
- Brown, S., I. Couchy, V. Fraissier et B. Satiat-Jeunemaitre (2001). Microscopies, marquages et imageries de la cellule végétale: vers une analyse structurale et fonctionnelle du protéome. CNRS. Gif-sur-Yvette, Dynamique de la Compartimentation Cellulaire Institut des Sciences du Végétal CNRS: 16.

- Brune, G., Schoberth, S. M., Sahm, H. (1983). " Growth of a strictly anaerobic bacterium growing on furfural (2-furaldehyde)." *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** (5): 1187-1192.
- Buffière, P. (1996). Etude et modélisation de l'influence de l'hydrodynamique sur les performances d'un réacteur de méthanisation à lit fluidisé. Institut National des Sciences Appliquées. Toulouse: 177.
- Buffière, P., J. P. Bergeon et R. Moletta (2000a). " The inverse turbulent bed: a novel bioreactor for anaerobic treatment." *Water Research* **34** (2): 673-677.
- Buffière, P., C. Fonade et R. Moletta (1998b). " Mixing and phase hold-ups variations due to gas production in anaerobic fluidized- bed digesters: influence on reactor performance." *Biotechnology and Bioengineering* **60** (1): 36-43.
- Buffière, P. et R. Moletta (1999). " Some hydrodynamic characteristics of inverse three phase fluidized-bed reactors." *Chemical Engineering Science* **54**: 1233-1242.
- Buffière, P. et R. Moletta (2000b). " Collision frequency and collisional particle pressure in three-phase fluidized beds." *Chemical Engineering Science* **55**: 5555-5563.
- Buffiere, P., J. P. Steyer, C. Fonade et R. Moletta (1998a). " Modeling and experiments on the influence of biofilm size and mass transfer in a fluidized bed reactor for anaerobic digestion." *Water Research* **32** (3): 657-668.
- Bull, M. A., R. M. Sterritt et J. N. Lester (1983). " An evaluation of four start-up regimes for anaerobic fluidized bed reactors." *Biotechnology Letters* **5** (5): 333-338.
- Bura, R., M. Cheung, B. Liao, J. Finlayson, B. C. Lee, I. G. Droppo, L. G. G. et L. S. N. (1998). " Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix." *Water Sciences and Technology* **37** (4-5): 325-333.
- Bussher, H. J. et H. C. van der Mei (2000). Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. 59th symposium of the society for general microbiology, D. G. e. a. Alison, Society for General Microbiology, university of Exeter (UK).
- Camilleri, C. (1988). Start-up of fixed-film stationary bed anaerobic reactors. 5th International Symposium On Anaerobic Digestion, H. E.R. et N. Hobson, Pergamon press, Bologna (Italy).
- Cecchi, F., P. Pavan et J. Mata-Alvarez (1992). " Fast digester start-up under mesophilic conditions using thermophilic inoculum." *Water Science and Technology* **25** (4/5): 391-398.
- Celis-García, L., E. Razo-Flores et O. Monroy (2005). Sulfate reduction in biofilms: performance of an inverse fluidized bed reactor. VIII Latin American Workshop and

- Symposium on Anaerobic Digestion, L. Borzacconi, E. Castello, C. Etchebehere, S. Gutiérrez et I. Lopez, IWA, Punta del Este - Uruguay.
- Characklis, W. G. et K. C. Marshall (1990). Biofilms. John Wiley & Sons Inc., New York, Ecological and applied microbiology, 796.
- Characklis, W. G. et K. C. Marshall (1990). Biofilms. John Wiley & Sons Inc., New York, 796.
- Chen, S. J., C. T. Li et W. K. Shieh (1985). " Performance evaluation of the anaerobic fluidized bed biofilm reactor: methane production from glucose." *Proceedings of the Industrial Waste Conference*: 925-936.
- Chen, S. J., C. T. Li et W. K. Shieh (1988). " Anaerobic fluidized bed treatment of an industrial wastewater." *Journal of Water Pollution Control Federation* **60** (10): 1826-1832.
- Cho, J. C. et S. J. Kim (2000). " Increase in Bacterial Community Diversity in Subsurface Aquifers Receiving Livestock Wastewater Input." *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (3): 956-965.
- Choi, E., Z. Yun, Y. Park, H. Lee, H. Jeong, K. Kim, K. Rho et K. Gil (2001). " Extracellular polymeric substances in relation to nutrient removal from a sequencing batch biofilm reactor." *Water Science and Technology* **43** (6): 185-192.
- Clancy, P. B., N. Venkataraman et L. R. Lynd (1992). " Biochemical inhibition of sulfate reduction in batch and continuous anaerobic digesters." *Water Science and Technology* **25** (7): 51-60.
- Clapp, J. P. (1999). The identification of root-associated fungi by polymerase chain reaction-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). Molecular Microbial Ecology Manual. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas et F. J. de Bruijn. Dordrecht/ Boston/ London, Kluwer Academic Publishers: 1-18.
- Coates, J. D., V. K. Bhupathiraju, L. A. Achenbach, M. J. McInerney et D. R. Lovley (2001). " Geobacter hydrogenophilus, Geobacter chapellei and Geobacter grbiciae, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers." *Int J Syst Evol Microbiol* **51** (2): 581-588.
- Colberg, P. J. (1988). Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. Biology of Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 333-372.
- Coma, J., A. Jabbouri, A. Grasmick et S. Elmaleh (1990). " Flocculation en lit fluidisé." *Water Research* **24** (3): 361-366.

- Comte, M. P. (1998). Etude d'un nouveau réacteur triphasique: le lit turbulé inverse. Toulouse, INSA.
- Comte, M. P., D. Bastoul, G. Hebrard, M. Roustan et V. Lazarova (1997). " Hydrodynamics of a three-phase fluidized bed --- the inverse turbulent bed." *Chemical Engineering Science* **52** (21/22): 3971-3977.
- Cord-Ruwisch, R., D. R. Lovley et B. Schink (1998). " Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners." *Applied and Environmental Microbiology* **64** (6): 2232-2236.
- Cortizo, M. C. et M. F. L. de Mele (2003). " Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19** (8): 805-810.
- Costerton, B. et P. Stewart (2001). " Les Biofilms." *Pour la Science* **287** (septembre): 48-53.
- Costerton, J. W. (1999). " Introduction to biofilm." *International Journal of Antimicrobial Agent* **11**: 217-221.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber et G. James (1994). " Biofilms, the customized microniche." *Journal of Bacteriology* **176** (8): 2137-2142.
- Dabert, P., J.-P. Delgenès, R. Moletta et J.-J. Godon (2002). " Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics." *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* **1**: 39-49.
- Davey, M. E. et G. A. O'Toole (2000). " Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics." *Microbiology and Molecular Biology Review* **64** (4): 847-867.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton et E. P. Greenberg (1998). " The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm." *Science* **280** (5361): 295-298.
- de Kievit, T. R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown et B. H. Iglewski (2001). " Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns." *Appl. Envir. Microbiol.* **67** (4): 1865-4117.
- Delbès, C., J.-J. Godon et J.-J. Moletta (1998). " 16S rDNA sequence diversity in a culture-accessible part of the bacterial community of an anaerobic digester." *Anaerobe* **4**: 267-275.
- DeLong, E. F., G. S. Wickham et N. R. Pace (1989). " Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells." *Science* **243** (March): 1360-1363.

- Demeyer, A., F. Jacob, M. Jay, G. Menguy et J. Perrier (1981). La fermentation méthanique. La conversion bioénergétique du rayonnement solaire et les biotechnologies. Paris, Technique et Documentation: 213-249.
- Demirel, B. et O. Yenigun (2004). " Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: the effects of variations in hydraulic retention time with no pH control." J. Chem. Technol. Biotechnol. **79**: 755-760.
- Diez-Blanco, V., P. Garcia-Encina et F. Fernandez-Polanco (1995). " Effect of biofilm growth, gas and liquid velocities on the expansion of an anaerobic fluidized bed reactor." Water Research **29** (7): 1649-1654.
- Dignac, M.-F., V. Urbain, D. Rybacki, A. Bruchet, D. Snidaro et P. Scribe (1998). " Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure." Water Science and Technology **38** (8-9): 45-53.
- Disetti, J. J. (1991). Dépollution et valorisation énergétique des vinasses de distilleries par méthanisation. Journées Nationales sur la Digestion Anaérobie, A. Attalet R. Moletta, INRA-Narbonne.
- Dochain, D., J.-P. Steyer, A. Genovesi, A. Franco, A. Punal, E. Roca, J. M. Lema, M. Polit, R. Lapa, J. Canals et D. Perez (2000). Advanced monitoring and control of anaerobic wastewater treatment plants: 1 - Survey and process description. 5th International Symposium: Systems analysis and Computing in Water Quality Management, I. I. W. Association et W. 2000, Gent (Belgium), 18-20 September.
- Dolfing, J. (1985). " Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentrations." Applied Microbiology and Biotechnology **22**: 77-81.
- Dolfing, J. (1988). Acetogenesis. Biology of Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 417-468.
- Dorigoa, U., L. Volatierb et J. F. Humberta (2005). " Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities." Wat. Res. **39**: 2207-2218.
- Drury, W., W. Characklis et P. Stewart (1993). " Interactions of 1 µm latex particles with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Water Research **27** (7): 1119-1126.
- Dubourguier, H. C., D. B. Archer, G. Albagnac et G. Prensier (1988). Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates. 5 th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, E. R. Hallet P. N. Hobson, Pergamon Press, New York.
- Dunbar, J., S. Takala, S. M. Barns, J. A. Davis et C. R. Kuske (1999). " Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning." Appl Environ Microbiol **65** (4): 1662-1669.

- Dunsmore, B. C., A. Jacobsen, L. Hall-Stoodley, C. J. Bass, H. M. Lappin-Scott et P. Stoodley (2002). " The influence of fluid shear on the structure and material properties of sulphate-reducing bacterial biofilms." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**: 347 – 353.
- Durmaz, B. et F. D. Sanin (2001). " Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge." *Water Science and Technology* **44** (10): 221-229.
- Edeline, F. (1997). L'épuration biologique des eaux. Théorie et technologie des réacteurs. CEBEDOC, Paris, TEC&DOC, 303.
- Ehlinger, F., J. M. Audic et G. M. Faup (1989). " Influence of seeding conditions on initial biofilm development during the startup of anaerobic fluidized bed reactors." *Water Science and Technology* **21** (Brighton): 157-165.
- Ehlinger, F., J. M. Audic, D. Verrier et G. M. Faup (1987). " The influence of the carbon source on microbiological clogging in an anaerobic filter." *Water Science and Technology* **19** (1-2): 261-273.
- Ehlinger, F., Y. Escoffier, J. P. Couderc, J. P. Leyris et R. Moletta (1994). " Development of an automatic control system for monitoring an anaerobic fluidized-bed." *Water Science and Technology* **29** (10/11): 289-295.
- Eichler, B. et B. Schink (1984). " Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe." *Arch. Microbiol.* **140**: 147-152.
- El-Mamouni, R., R. Leduc et S. R. Guiot (1998). " Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process." *Water Science and Technology* **38** (8-9): 341-347.
- Elmaleh, S., A. Grasmick et A. Guitonas (1984). *Epuration par cellules anaerobies immobilisées sur un support fluidisé.* 37th Int. Conf. Cebedeau, Liege (Belgium).
- Farely, V., F. A. Rainey et E. Stackebrandt (1995). " Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2798-2801.
- Fauque, G. D. (1995). *Ecology of sulfate-reducing bacteria.* Sulfate-Reducing Bacteria. New York and London, Barton, L. L.: 217-241.
- Felske, A., A. D. L. Akkermans et W. M. De Vos (1998). " Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints." *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (11): 4581-4587.

- Fernandez, A., S. A. Hashsham, S. L. Dollhopf, L. Raskin, O. Glagoleva, F. B. Dazzo, R. F. Hickey, C. S. Criddle et J. M. Tiedje (2000). " Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose." *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (9): 4058-4067.
- Fernandez, A., S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle et J. Tiedje (1999). " How stable is stable? Function versus community composition." *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (8): 3697-704.
- Fernandez, N., F. Fdz-Polanco, S. J. Montalvo et D. Toledano (2001). " Use of activated carbon and natural zeolite as support materials, in an anaerobic fluidised bed reactor, for vinasse treatment." *Water Science and Technology* **44** (4): 1-6.
- Ferry, J. G. (1993). *Methanogenesis - Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Chapman & Hall, New York-London, Chapman & Hall Microbiology Series, 536.
- Ferry, J. G. (1999). " Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways." *FEMS Microbiology Reviews* **23** (1): 13-38.
- Fisher, M. M. et E. W. Triplett (1999). " Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities." *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (10): 4630-4636.
- Flemming, H. C. et J. Wingender (2001(a)). " Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: structural and ecological aspects." *Water Science and Technology* **43** (6): 1-8.
- Florencio, L., P. Jenicek, J. A. Field et G. Lettinga (1993). " Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **75** (5): 368-374.
- Fox, P., M. T. Suidan et J. Bandy (1990). " A comparison of media types in acetate fed expanded bed anaerobic reactors." *Water Research* **24** (7): 827-835.
- Fox, P. et V. Venkatasubbiah (1996). " Coupled anaerobic/aerobic treatment of high-sulfate wastewater with sulfate reduction and biological sulfide oxidation." *Water Science and Technology* **34** (5-6): 359-366.
- Freese, L. H. et D. C. Stuckey (2000). " Influence of seed inoculum on the start-up of an anaerobic baffled reactor." *Environmental Technology* **21** (8): 909-918.
- Fruteau, H. et Y. Membrez (2004). *Réalisation d'un référentiel technico-économique des unités de méthanisation de produits organiques agricoles et non agricoles à petite échelle en Europe lot 1 et 2 - Synthèse*. O. Théobald, ADEME: 11.

- Fry, N. K., J. K. Fredrickson, S. Fishbain, M. Wagner et D. A. Stahl (1997). " Population Structure of Microbial Communities Associated with Two Deep, Anaerobic, Alkaline Aquifers." *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (4): 1498-1504.
- García-Calderón, D. (1997). Hydrodynamique et conversion d'un réacteur anaérobie en fluidisation inverse. Groupe de Génie des Procédés. Montpellier (France), Université des Sciences et Techniques du Languedoc (UMII): 180.
- Garcia-Encina, P. et F. Fernandez Polanco (1987). " Behaviour of an anaerobic expanded bed reactor in non steady state conditions." *Water Research* **21** (11): 1329-1334.
- Garcia-Morales, J. L., L. I. Romero et D. Sales (2003). " Influence of operational conditions on biofilm specific activity of a an anaerobic fluidized bed reactor." *Water Science and Technology* **47** (5): 197-200.
- Ghigo, J. M. (2003). " Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt?" *Research in Microbiology* **154**: 1–8.
- Gijzen, H. et F. Kansiime (1996). " Comparison of start-up of an upflow anaerobic sludge blanket reactor and a polyurethane carrier reactor." *Water Science and Technology* **34** (5/6): 509-515.
- Ginter, M. O. et A. M. Grobicki (1997). " Manganese removal mechanisms in a stirred USAB reactor." *Water Research* **31** (6): 1261-1268.
- Giovannoni, S. J., E. F. Delong, G. J. Olsen et N. R. Pace (1988). " Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells." *Journal of Bacteriology* **170** (2): 720-726.
- Gjaltema, A., N. v. d. Marel, M. C. M. v. Loosdrecht et J. J. Heijnen (1997). " Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: hydrodynamics conditions versus surface characteristics." *Biotechnology And Bioengineering* **55** (6): 881-889.
- Gjaltema, A., L. Tijhuis, M. C. M. van Loosdrecht et J. J. Heijnen (1995). " Detachment of biomass from suspended nongrowing spherical biofilms in airlift reactors." *Biotechnology and Bioengineering* **46** (3): 258-269.
- Gjaltema, A., M. C. M. van Loosdrecht et J. J. Heijnen (1991). Biofilm development on suspended carriers. International Symposium on Environmental Biotechnology, Ostend (Belgium).
- Godon, J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit et R. Moletta (1997a). " Microbial 16S rDNA diversity in an anaerobic digester." *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (7): 2802-2813.

- Godon, J. J. et R. Moletta (1998b). " A molecular identity card for wastewater microorganisms." *Biofutur* (178): 38-40.
- Gonzalez-Gil, G., R. Kleerebezem et G. Lettinga (1999). " Effects of Nickel and Cobalt on Kinetics of Methanol Conversion by Methanogenic Sludge as Assessed by On-Line CH₄ Monitoring." *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (4): 1789-1793.
- Gonzalez-Gil, G., P. N. L. Lens, A. Van Aelst, H. Van As, A. I. Versprille et G. Lettinga (2001). " Cluster Structure of Anaerobic Aggregates of an Expanded Granular Sludge Bed Reactor." *Appl. Envir. Microbiol.* **67** (8): 3683-5284.
- González, G., F. Ramírez et O. Monroy (1992). " Development of biofilm in anaerobic reactors." *Biotechnology Letters* **14** (2): 149-154.
- Goodwin, J. A. S., D. A. J. Wase et C. F. Forster (1990). " Anaerobic digestion of ice-cream wastewaters using the UASB process." *Biological Wastes* **32** (2): 125-144.
- Gorris, L. G. M., C. van der Drift et G. D. Vogels (1988). " Separation and quantification of cofactors from methanogenic bacteria by high-performance liquid chromatography: optimum and routine analyses." *Journal of Microbiological Methods* **8** (3): 175-190.
- Grotenhuis, J. T. C., M. Smit, C. M. Plugge, X. Yuansheng, A. A. M. Van Lammeren, A. J. M. Stams et A. J. B. Zehnder (1991). " Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates." *Appl. Environ. Microbiol.* (57): 1942-1949.
- Gujer, W. et A. J. B. Zehnder (1983). " Conversion processes in anaerobic digestion." *Wat. Sci. Technol.* **15**: 127-167.
- Gupta, A., J. R. V. Flora, M. Gupta, G. D. Sayles et M. T. Suidan (1994). " Methanogenesis and sulfate reduction in chemostats--I. Kinetic studies and experiments." *Water Research* **28** (4): 781-793.
- Guschin, D. Y., B. K. Mobarry, D. Proudnikov, D. A. Stahl, B. E. Rittmann et A. D. Mirzabekov (1997). " Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2397-2402.
- Guyot, J. P. (1990). Etude de quelques interactions microbiennes lors de la digestion anaérobie de la matière organique par des cultures mixtes définies ou naturelles., Université de Provence Aix-Marseille I.
- Hall-Stoodley, L. et P. Stoodley (2002). Developmental regulation of microbial biofilms, *Current Opinion in Biotechnology*, 228-233.

- Hall, E. R. (1987). " Biofilm reactors in anaerobic wastewater treatment." *Biotechnology Advances* **5** (2): 257-269.
- Hao, O. I., J. M. Chen, L. Huang et R. L. Buglass (1996). " Sulfate-reducing Bacteria." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **26** (1): 155 -187.
- Hao, O. J., J. M. Chen, L. Huang et R. L. Buglass (1996). " Sulfate-reducing bacteria." *Crit. Rev. Environ.l Sci. Technol.* **26**: 155-187.
- Harada, H., S. Uemura et K. Momonoi (1994). " Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate." *Water Research* **28** (2): 355-367.
- Harmsen, H. J. M., A. D. L. Akkermans, A. J. M. Stams et W. de Vos (1996). " Population Dynamics of Propionate-Oxidizing Bacteria under Methanogenic and Sulfidogenic Conditions in Anaerobic Granular Sludge." *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (6): 2163-2168.
- Hassett, D. J., J. Cuppoletti, B. Trapnell, S. V. Lyman, J. J. Rowe, S. Sun Yoon, G. M. Hilliard, K. Parvatiyar, M. C. Kamani et D. J. Wozniak (2002). " Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets." *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** (11): 1425-1443.
- Heertjes, P. M. et R. R. van der Meer (1978). " Dynamics of liquid flow in an up-flow reactor used for anaerobic treatment of wastewater." *Biotechnology and Bioengineering* **20**: 1577-1594.
- Heijnen, J. J., A. Mulder, W. Enger et F. Hoeks (1989). " Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in waste-water treatment." *The Chemical Engineering Journal* **41** (3): B37-B50.
- Heijnen, J. J., M. C. M. Van Loosdrecht, A. Mulder et L. Tijhuis (1992). " Formation of biofilms in a biofilm air-lift suspension reactor." *Water Science and Technology* **26** (3/4): 647-654.
- Henry, M. et C. Varaldo (1988). Anaerobic digestion treatment of chemical industry wastewaters at the Cuise-Lamotte (Oise) plant of Société française Hoechst. Proc. 5th Int. Symp. On Anaerobic Digestion, E. R. Hallet P. N. Hobson, Pergamon Press, New York.
- Henze, M. et P. Harremoës (1983). " Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - A literature review." *Water Science and Technology* **15** (8-9): 1-101.

- Henze, M. et P. Harremoës (1983). " Anaerobic treatment of wastewater in fixed film reactors - a litterature review." *Wat. Sci. Tech.* **15**: 1 -101.
- Heppner, B., G. Zellner et H. Diekmann (1992). " Start-up and operation of a propionate-degrading fluidized-bed reactor." *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**: 810-816.
- Herbert-Guillou, D., B. Tribollet et D. Festy (2001). " Influence of the hydrodynamics on the biofilm formation by mass transport analysis." *Bioelectrochemistry* **53**: 119–125.
- Hofman-Bang, J., D. Zheng, P. Westermann, B. K. Ahring et L. Raskin (2003). " Molecular ecology of anaerobic reactor systems." *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **81**: 151-203.
- Holst, T. C., A. Truc et R. Pujol (1997). " Anaerobic fluidized beds: ten years of industrial experience." *Water Science and Technology* **36** (6/7): 415-422.
- Hristova, K. R., M. M. Mau, D. Zheng, R. I. Aminov, R. I. Mackie, H. R. Gaskins et L. Raskin (2000). " Desulfotomaculum genus- and subgenus-specific 16S rRNA hybridization probes for environmental studies." *Environmental Microbiology* **2** (2): 143-159.
- Hsu, Y. et W. K. Shieh (1993). " Startup of anaerobic fluidized bed reactors with acetic acid as the substrate." *Biotechnology and Bioengineering* **41** (3): 347-353.
- Huang, C.-T., S. W. Peretti et J. D. Bryers (1994). " Effects of medium carbon to nitrogen ratio on biofilm formation and plasmid stability." *Biotechnology and Bioengineering* **27**: 1482-1489.
- Huang, J. et K. L. Pinder (1995). " Effects of calcium on development of anaerobic acidogenic biofilms." *Biotechnology and Bioengineering* **45** (3): 212-218.
- Huang, J. S., J. L. Yan et C. S. Wu (2000). " Comparative bioparticle and hydrodynamic characteristics of conventional and tapered anaerobic fluidized-bed bioreactors." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **75** (4): 269-278.
- Hulshoff Pol, L. W., S. I. de Castro Lopes, G. Lettinga et P. N. L. Lens (2004). " Anaerobic sludge granulation." *Water Research* **38** (6): 1376-1389.
- Hulshoff Pol, L. W., P. N. Lens, A. J. M. Stams et G. Lettinga (1996). Perspectives for anaerobic treatment of sulfate-rich wastewaters. IV Seminario -Taller sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales, Bucaramanga, Colombia.
- Huser, B. A., K. Wuhrmann et A. J. B. Zehnder (1982). " Methanothrix soehngenii gen. Nov. Sp. Nov., a new acetotrophic non hydrogen-oxidizing methane bacterium." *Arch. Microbiol.* **132**: 1-9.

- Ito, T., S. Okabe, H. Satoh et Y. Watanabe (2002). " Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions." *Applied and Environmental Microbiology* **68** (3): 1392-1402.
- IWA, Ed. (2002). Anaerobic digestion Model n°1 (ADM1). Scientific and Technical Report n°13. 2002, IWA.
- Iwai, S. et T. Kitao (1994). Wastewater treatment with microbial films. Technomic publishing, USA, 184.
- Iza, J. (1991). " Fluidized bed reactors for anaerobic wastewater treatment." *Wat. Sci. Tech.* **24** (8): 109-132.
- Iza, J., P. A. Garcia, I. Sanz, S. Hernando et F. Fdz-Polanco (1988). Anaerobic fluidized bed reactors (AFBR): performance and hydraulic behaviour. 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, E. R. Hallet N. Hobson, Pergamon, Bologna (Italy).
- Jahn, A. et P. H. Nielsen (1998). " Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms." *Water Science and Technology* **37** (1): 17-24.
- James, G., L. Beaudette et C. J. (1995). " Interspecies bacterial interactions in biofilms." *Journal of Industrial Microbiology* **15**: 257-262.
- Jee, H. S., T. Mano, N. Nishio et S. Nagai (1988). " Influence of redox potential on methanation of methanol by *Methanosarcina barkeri* in E_h-stat batch culture." *Journal of Fermentation Technology* **66** (1): 123-126.
- Jeris, J. S. (1983). " Industrial wastewater treatment using anaerobic fluidized bed reactors." *Water Science and Technology* **15**: 169-176.
- Johansen, T., C. R. Carlson et A. B. Kolsto (1996). " Variable numbers of rRNA gene operons in *Bacillus cereus* strains." *FEMS Microbiol Lett* **136** (3): 325-328.
- Jorand, F., F. Boué-Bign, J.-C. Block et V. Urbain (1998). " Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances." *Water Science and Technology* **37** (4-5): 307-315.
- Kang, H. et W. P. Tritt (1997). Slaughterhouse wastewater treatment in a bamboo ring anaerobic fixed bed reactor. 8th International Conference On Anaerobic Digestion, Sendai (Japan).
- Kennedy, K. J. et R. L. Droste (1987). " Diffusional limitations of anaerobic biofilms." *Canadian Journal of Civil Engineering* **14** (5): 631-637.

- Kida, K., S. Morimura, Y. Sonoda, M. Obe et T. Kondo (1990). " Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized-bed reactor." *Journal of Fermentation and Bioengineering* **69** (6): 354-359.
- Kim, M., Y. H. Ahn et R. E. Speece (2002). " Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic." *Water Research* **36** (17): 4369-4385.
- Kjelleberg, S. et S. Molin (2002). " Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?" *Current Opinion in Microbiology* **5** (3): 254-258.
- Kleerebezem, R. et H. Macarie (2003). " Treating industrial wastewater: Anaerobic digestion comes of age." *Chemical Engineering* **110** (4): 56-64.
- Klein, C. (2005). *Principes de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM)*. INSERN. Jussieu, IFR58.
- Kristjanson, J. K., P. Schönheit et R. K. Thauer (1982). " Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: An explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate." *Archive of Microbiology* **131**: 278-282.
- Kuhner, C. H., C. Frank, A. Griesshammer, M. Schmittroth, G. Acker, A. Gossner et H. L. Drake (1997). " *Sporomusa silvacetica* sp. nov., an acetogenic bacterium isolated from aggregated forest soil." *Int J Syst Bacteriol* **47** (2): 352-358.
- Kuroda, M., M. Yuzawa, Y. Kakibara et M. Okamura (1988). " Methanogenic bacteria adhered to solid supports." *Water Research* **22** (5): 653-656.
- Laanbroek, H., T. Abee et J. Voogd (1982). " Alcohol conversion by *Desulfolobus propionicus* Lindhorst in the presence and absence of sulfate and hydrogen." *Arch. Microbiol.* **133**: 178-184.
- Laguérie, C. et P. Guigon (1991). *La fluidisation*. Technique et Documentation - Lavoisier, Toulouse, Récents progrès en génie des procédés, 416.
- Laimé, M. (2003). *Dossier sur l'eau*. Hervé Hamon, Paris, 401.
- Lara, R., S. Cerutti, J. A. Salonia, R. A. Olsina et L. D. Martinez (2005). " Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES." *Food and Chemical Toxicology* **43** (2): 293.
- Larsen, T. A. et P. Harremoës (1994). " Degradation mechanisms of colloidal organic matter in biofilm reactors." *Water Research* **28** (6): 1443-1452.
- Lauwers, A. M., W. Heinen, L. G. M. Gorris et C. Van der Drift (1989). " Variation of parameters affecting the start-up of methanogenic fluidized bed reactors." *Biotechnology Letters* **11** (12): 907-912.

- Law, C. L., S. M. Tasirin, W. R. W. Daud et P. P. Ng (2004). " Effect of vertical internal baffles on fluidization hydrodynamics and grain drying characteristics." *Chinese Journal of Chemical Engineering* **12** (6): 801-808.
- Lazarova, V. et J. Manem (1995). " Biofilm Characterization and Activity Analysis in Water and Wastewater Treatment." *Water Research* **29** (10): 2227-2245.
- Leclerc, M., C. Delbès, R. Moletta et J.-J. Godon (2001). " Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester." *FEMS Microbiology Ecology* **34**: 213-220.
- Lee, D. H., Y. G. Zo et S. J. Kim (1996). " Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism." *Applied And Environmental Microbiology* **62** (9): 3112-3120.
- Lens, P. N., M.-P. De Poorter, C. C. Cronenberg et W. H. Verstraete (1995). " Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems." *Water Research* **29** (3): 871-880.
- Lettinga, G. (2005). Personal communication. Montevideo, Uruguay.
- Lettinga, G., S. Hobma, L. Hulshoff Pol, W. De Zeeuw, P. De Jong, P. Grin et R. Roersma (1983). " Design operation and economy of anaerobic treatment." *Water Science and Technology* **15** (Copenhagen): 177-195.
- Lettinga, G. et L. W. Hulshoff Pol (1990). Design and operational experiences with the UASB process. *Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en America Latina*, A. Noyola, J. P. Guyot, J. F. Calzada et Ortiz, Universidad Nacional Autonoma de México.
- Lettinga, G., A. Van Nelsen, S. Hobma, W. de Zeeuw et A. Klapwijk (1980). " Use the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment." *Biotechnology and Bioengineering* **22**: 699-734.
- Li, Y. Y., S. Lam et H. H. P. Fang (1996). " Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate." *Water Res.* **30**: 1555-1562.
- Liesack, W., H. Weyland et E. Stackebrandt (1991). " Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria." *Microb. Ecol.* **21**: 191-198.
- Liu, J., G. Olsson et B. Mattiasson (2004). " Monitoring and control of an anaerobic upflow fixed-bed reactor for high-loading-rate operation and rejection of disturbances." *Biotechnology and Bioengineering* **87** (1): 43-53.

- Liu, W.-T., T. L. Marsh, H. Cheng et L. J. Forney (1997). " Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA." *Applied And Environmental Microbiology* **63** (11): 4516-4522.
- Liu, Y. et J.-H. Tay (2002). " The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge." *Water Research* **36** (7): 1653-1665.
- Liu, Y. et J. H. Tay (2002). " The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge." *Water Research* **36** (7): 1653-1665.
- Liu, Y., H.-L. Xu, S.-F. Yang et J.-H. Tay (2003). " Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor." *Water Research* **37** (3): 661-673.
- Lovell, C. R. et Y. Hui (1991). " Design and testing of a functional group-specific DNA probe for the study of natural populations of acetogenic bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (9): 2602-2609.
- Ludvigsen, L., H. J. Albrechtsen, G. Heron, P. L. Bjerg et T. H. Christensen (1998). " Anaerobic microbial redox processes in a landfill leachate contaminated aquifer (Grindsted, Denmark)." *Journal of Contaminant Hydrology* **33** (3-4): 273-291.
- Marengo, E. et M. Aceto (2003). " Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines." *Food Chemistry* **81** (4): 621.
- Marin, P., D. Alkalay, L. Guerrero, R. Chamy et M. C. Schiappacasse (1999). " Design and startup of an anaerobic fluidized bed reactor." *Water Science and Technology* **40** (8): 63-70.
- Martín-Cereceda, M., A. M. Alvarez, S. Serrano et A. Guinea (2001). " Confocal and light microscope examination of protozoa and other micro-organisms in the biofilms from a rotating biological contactor wastewater treatment plant." *Acta Protozoologica* **40** (4): 263-272.
- Massol-Deya, A., D. A. Odelson, R. F. Hickey et J. M. Tiedje (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). Molecular Microbial Ecology Manual. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas et F. J. de Bruijn. Dordrecht/ Boston/ London, Kluwer Academic Publishers. **3.3.2**: 1-8.
- Mathews, C. K., K. E. van Holde et K. G. Ahern (1999). Biochemistry. Heyden, R., San Francisco, 1186.

- Matsumoto, A. et T. Noike (1991). " Effects of substrate composition and loading rate on methanogenic process in anaerobic fluidized bed systems." *Wat. Sci. Technol.* **23**: 1311-1317.
- McCarty, P. L. et A. Bachman (1987). A bioconversion reactor. European Patent Office.
- McInerney, M. J. (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. Biology of Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 373-416.
- McInerney, M. J., M. P. Bryant, R. B. Hespell et J. W. Costerton (1981). " Syntrophomonas wolfei gen. Nov. Sp. Nov., an anaerobic syntrophic fatty acid-oxidizing bacterium." *Appl. Environ. Microbiol.* **41** (4): 1029-1039.
- Melo, L. F. et M. J. Vieira (1999). " Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration." *Bioprocess Engineering* (20): 363-368.
- Melvin, W. T. et P. N. Hobson (1994). " Identification of anaerobic digester bacteria using a polymerase chain reaction method." *Biores. Technol.* **47**: 73-80.
- Meraz, M., A. Gonzalez-Barrera, J. Alvarez-Ramirez et O. Monroy (1996). " Dynamics of the immobilization of anaerobic mesophilic bacteria on a plastic support." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57/58**: 525-534.
- Merkel, W., W. Manz, U. Szewzyk et K. Krauth (1999). " Population dynamics in anaerobic wastewater reactors: modeling and *in situ* characterization." *Wat. Res.* **33** (10): 2392-2402.
- Michaud, S. (2001). Etude hydrodynamique et biologique d'un procédé de méthanisation à biofilm: le réacteur à lit turbulent inverse. Toulouse, Institut National des Sciences Appliquées: 195.
- Michaud, S., N. Bernet, P. Buffière, M. Roustan et R. Moletta (2002). " Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors." *Water Research* **36**: 1385–1391.
- Michaud, S., N. Bernet, J. P. Delgenès et M. Roustan (2003). " Influence of hydrodynamic conditions on biofilm behavior in a methanogenic inverse turbulent bed reactor." *Biotechnology Progress* **19** (3): 858-863.
- Miller, M. B. et B. L. Bassler (2001). " Quorum sensing in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-99.
- Moeseneder, M. M., J. M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter et G. J. Herndl (1999). " Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for

- complex marine bacterioplankton communities and comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3518-3525.
- Moletta, R. (1993). " La digestion anaérobie: du plus petit au plus grand." *Biofutur* **119** (jan): 16-25.
- Moletta, R., coordonnateur, Ed. (2002). Gestion des problèmes environnementaux dans les industries agroalimentaires. Sciences & Techniques agroalimentaires. Paris, Tec et Doc.
- Morgan, J. W., L. M. Evison et C. F. Forster (1991). " Changes to the Microbial Ecology in Anaerobic Digesters Treating Ice-Cream Wastewater during Start-up." *Wat. Res.* **25** (6): 639-653.
- Moteleb, M. A., M. T. Suidan, J. Kim et S. W. Maloney (2002). " Pertubated loading of a formaldehyde waste in an anaerobic granular activated carbon fluidized bed reactor." *Water Research* **36** (15): 3775-3785.
- Murray, W. et L. van der Berg (1981). " Effect of support material on the development of microbial fixed films converting acetic acid to methane." *Journal of Applied Bacteriology* **51**: 257-265.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer et C. Wawer (1998). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. Molecular Microbial Ecology Manual. A. D. L. Akkermans, J. Dirk van Elsas et F. J. de Bruijn. Dordrecht/ Boston/ London, Kulwer Academic Publishers. **3.4.4**: 1-27.
- Myers, R. M., T. Maniatis et L. S. Lerman (1987). " Detection and localization of single base ghangnes by denaturing gradient gel electrophoresis." *Meth. Enzymol.* **155**: 501-527.
- Myska, J. et J. Svec (1994). " The distributive properties of a fluidized bed with biomass." *Water Research* **28** (7): 1653-1658.
- Nalin, R., L. Ranjard, S. Nazaret et P. W. Simonet (1998). " La biologie moléculaire en écologie microbienne du sol: application à l'analyse de la strucutre des communautés bactériennes." *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **13**: 21-26.
- Nicolella, C., M. C. M. van Loosdrecht et S. J. Heijnen (2000). " Particle-based biofilm reactor technology." *Trends in Biotechnology* **18** (7): 312-320.
- Nicollela, C., R. Di Felice et M. Rovatti (1997). " Biomass Concentration in Fluidized Bed Biological Reactors." *Wat. Res.* **31** (4): 936-940.
- Nüsslein, K. et J. M. Tiedje (1999). " Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil." *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (8): 3622-3626.

- Okabe, S., T. Ito et H. Satoh (2003). " Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions." *Applied Microbiology and Biotechnology* **63** (3): 322-334.
- Okabe, S., T. Matsuda, H. Satoh, T. Itoh et Y. Watanabe (1998). " Sulfate reduction and sulfide oxidation in aerobic mixed population biofilms." *Water Science and Technology* **37** (4-5): 131-138.
- Omil, F., C. D. Bakker, L. W. H. Pol et G. Lettinga (1997). " Effect of pH and low temperature shocks on the competition between sulphate reducing bacteria and methane producing bacteria in UASB reactors." *Environmental Technology* **18** (3): 255-264.
- Oremland, R. S. (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. Biology of Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 641-706.
- Osborn, A. m., E. R. B. Moore et K. N. Timmis (2000). " An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics." *Environ. Microbiol.* **2** (1): 39-50.
- Osuna, M. B., M. H. Zandvoort, J. M. Iza, G. Lettinga et P. N. L. Lens (2003). " Effects of trace element addition on volatile fatty acid conversions in anaerobic granular sludge reactors." *Environmental Technology* **24** (5): 573-587.
- Oude Elferink, S. J. W. H., A. Visser, L. W. Hulshoff Pol et A. J. M. Stams (1994). " Sulfate reduction in methanogenic bioreactors." *FEMS Microbiology Reviews* **15**: 119-136.
- Oude Elferink, S. J. W. H., W. J. C. Vorstman, A. Sopjes et A. J. M. Stams (1998). " Characterization of the sulfate-reducing and syntrophic population in granular sludge from a full-scale anaerobic reactor treating papermill wastewater." *FEMS Microbiology Ecology* **27** (2): 185-194.
- Ouichanpagdee, P., M. Torrijos, P. Sousbie, E. Zumstein, J.-J. Godon et R. Moletta (2004). An anaerobic fixed bed reactor with Cloisonyle: study of the colonisation of the support and microbial monitoring using molecular tools. PS.III.011. 10th world congress - Anaerobic Digestion 2004. 10ème congrès mondial - Digestion Anaérobie 2004, International Water Association (IWA), Montréal, Canada, 29 août - 2 septembre.
- Pace, N. R. (1997). " A molecular view of microbial diversity and the biosphere." *Science* **276**: 734-740.

- Palmer, R. J. et C. Sternbreg (1999). " Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches." *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 263-268.
- Palmgren, R. et P. H. Nielsen (1996). " Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures." *Water Science and Technology* **34** (5-6): 233-240.
- Pandiyani, T., C. Duran de Bazua, K. Ilangovan et A. Noyola (1999). " ¹³C NMR studies on vinasses effluent treated with iron." *Water Research* **33** (1): 189.
- Paris, J. M., T. Vicent, M. D. Balaguer et C. Cassu (1988). Comparison of startup and performance of anaerobic filter and UASB reactors treating potato-starch wastewater. 5th International Symposium On Anaerobic Digestion, A. Tilcheet R. A., Monduzzi (Bologna), Bologna (Italy).
- Parkin, G. F., N. A. Lynch, W.-C. Kuo, E. L. Van Keuren et S. K. Bhattacharya (1990). " Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate." *Res. J. WPCF* **62** (6): 780-788.
- Patidar, S. K. et V. Tare (2004). " Effect of micro-nutrients in anaerobic degradation of sulfate laden organics." *Can. J. Civ. Eng./Rev. Can. Génie Civ.* **31** (3): 420 - 431.
- Paulo, P. L., B. Jiang, D. Cysneiros, A. J. M. Stams et G. Lettinga (2004). " Effect of Cobalt on the Anaerobic Thermophilic Conversion of Methanol." *Biotechnology And Bioengineering* **85** (4).
- Pauss, A. et S. Guiot (1993). " Hydrogen monitoring in anaerobic sludge bed reactors at various hydraulic regimes and loading rates." *Water Environment Research* **65** (3): 276-280.
- Percheron, G., N. Bernet et R. Moletta (1996). Digestion anaérobie d'un effluent riche en sulfate: influence de l'inoculum, du pH, de l'ajout de métaux essentiels et du procédé utilisé. Congrès SFM Microbiologie Industrielle et Environnement, Narbonne/17-20 avril.
- Percheron, G., N. Bernet et R. Moletta (1997). " Start-up of anaerobic digestion of sulfate wastewater." *Bioresource Technology* **61**: 21 - 27.
- Perez, M., L. I. Romero, E. Nebot et D. Sales (1997). " Colonisation of a porous sintered-glass support in anaerobic thermophilic bioreactors." *Bioresource Technology* **59** (2-3): 177-183.
- Pirbazari, M., T. C. Voice et W. J. Weber (1990). " Evaluation of biofilm development on various natural and synthetic media." *Hazardous Waste and Hazardous Materials* **7** (3): 239-250.

- Pohland, F. G. (1992). Anaerobic treatment: fundamental concepts, applications, and new horizons. Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. J. F. Malina, Pohland, F.G. Lancaster, Pa, Technomic: 1-40.
- Postgate, J. R. (1984). The sulfate-reducing bacteria. Postgate, J.R., Cambridge, 208.
- Prakash, R. et K. J. Kennedy (1996). " Kinetics of an anaerobic fluidized bed reactor using biolite Carrier." Canadian Journal of Civil Engineering **23**: 1305-1315.
- Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel et P. Lejeune (1999). " Abiotic Surface Sensing and Biofilm-Dependent Regulation of Gene Expression in Escherichia coli." J. Bacteriol. **181** (19): 5993-298.
- Prosser, J. (1993). " Detecting single-base mutations." TIBTECH **11** (June): 238-246.
- Puñal, A., M. Trevisan, A. Rozzi et J. M. Lema (2000). " Influence of C/N ratio on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors." Water Research **34** (9): 2614-2619.
- Purevdorj, B., J. W. Costeron et L. H. Stoodley (2002). " Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Applied and Environmental Microbiology **68** (9): 4457-4464.
- Quintard, M., C. Mouton, J.-M. Côme, S. Kaskassian, F. Nex, A. Roger, S. Traverse, M. Bohy, I. Pollet, O. Razakarisoa, G. Schäfer, F. Haeseler, P. Le Thiez, M. Ropars, R. Mose et T. Vogel (2004). Modélisation, atténuation, caractérisation dans les aquifères des composés organohalogénés - Etat de l'art, Programme R&D MACAOH - ADEME.
- Rajeshwari, K. V., M. Balakrishnan, A. Kansal, K. Lata et V. V. N. Kishore (2000). " State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment." Renewable and Sustainable Energy Reviews **4** (2): 135-156.
- Ranalli, G., P. Balsari, M. Colombo et C. Sorlini (1995). " Anaerobic expanded-bed laboratory digester for the treatment of swine slurries. COD removal and methane generation." Journal of Environmental Science and Health Part A - Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control **30** (7): 1397-1409.
- Raskin, L., B. E. Rittmann et D. A. Stahl (1996). " Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms." Applied and Environmental Microbiology **62** (10): 3847-3857.
- Raskin, L., D. Zheng, M. E. Griffin et F. de los Reyes (1995). Molecular studies of microbial populations dynamics in anaerobic biological treatment systems. Med. Fac. Landbouww., Univ. Gent.

- Ribeiro, R., M. B. A. Varesche, E. Foresti et M. Zaiat (2005). " Influence of the carbon source on the anaerobic biomass adhesion on polyurethane foam matrices." *Journal of Environmental Management* **74** (2): 187-194.
- Ronnow, P. H. et L. A.H. Gunnarsson (1982). " Response of growth and methane production to limiting amounts of sulfide and ammonia in two thermophilic methanogenic bacteria." *FEMS Microbiology Letters* **14** (4): 311-315.
- Roustan, M., B. Capdeville et D. Bastoul (1993). Influence of the hydrodynamic behaviour of a three phase fluidized bed used for effluent treatment. 3rd Int. Conference on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics, Cambridge (UK).
- Roustan, M., G. Hébrard, M.-P. Comte, C. Beck, D. Bastoul et J.-M. Audic (1995). " Etude hydrodynamique d'un réacteur à lit fluidisé inverse." *Récents Progrès en génie des Procédés* **9**: 81-86.
- Roy, F., E. Samain, H. C. Dubourguier et G. Albagnac (1986). " Syntrophomonas sapovorans sp. Nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids." *Arch. Microbiol.* **145** (142-147).
- Ruel, S. M., Y. Comeau, P. Ginestet et A. Heduit (2002). " Modeling acidogenic and sulfate-reducing processes for the determination of fermentable fractions in wastewater." *Biotechnology and Bioengineering* **80** (5): 525-536.
- Salkinoja-Salonen, M. S., E.-J. Nyns, P. M. Sutton, L. van den Berg et A. D. Wheatley (1983). " Starting-up of an anaerobic fixed-film reactor." *Water Science and Technology* **15** (Copenhagen): 305-308.
- Sanchez, J. M., S. Arijo, M. A. Munoz, M. A. Morinigo et J. J. Borrego (1994). " Microbial colonization of different support materials used to enhance the methanogenic process." *Applied Microbiology and Biotechnology* **41**: 480-486.
- Sanchez, O., S. Michaud, R. Escudié, J. P. Delgenès et N. Bernet (2005). " Liquid mixing and gas-liquid mass transfer in a three-phase inverse turbulent bed reactor." *Chemical Engineering Journal* **114**: 1-7.
- Santegoeds, C. M., L. R. Damgaard, G. Hesselink, J. Zopfi, P. Lens, G. Muyzer et D. de Beer (1999). " Distribution of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analyses." *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (10): 4618-4629.
- Schink, B. (1997). " Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation." *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **61** (2): 262-280.

- Schink, B., D. Kremer et T. Hansen (1987). " Pathway of propionate formation from ethanol in *Pelobacter propionicus*." *Arch. Microbiol.* **147**: 321-327.
- Schmidt, J. E. et B. K. Ahring (1999). " Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors." *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (3): 1050-1054.
- Seghezze, L., G. Zeeman, J. B. van Lier, H. V. M. Hamelers et G. Lettinga (1998). " A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors." *Bioresource Technology* **65** (3): 175.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Syutsubo, A. Ohashi, H. Harada et K. Nakamura (1998). " Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis." *Microbiology* **144** (9): 2655-2665.
- Shapiro, J. A. (1998). " Thinking about bacterial populations as multicellular organisms." *Annu Rev Microbiol* **52**: 81-104.
- Shimodaira, C. et Y. Yushina (1983). Biological wastewater treatment with downflow fluidized bed reactor. 3rd Pacific Chemical Engineering Congress, Seoul (Korea).
- Show, K.-Y., Y. Wang, S.-F. Foong et J.-H. J.-H. Tay (2004). " Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors." *Water Research* **38** (9): 2293-2304.
- Show, K. Y. et J. H. Tay (1999). " Influence of support media on biomass growth and retention in anaerobic filters." *Water Research* **33** (6): 1471-1481.
- Singh, R. P., S. Kumar et C. S. P. Ojha (1999). " Nutrient requirement for UASB process: a review." *Biochemical Engineering Journal* **3** (1): 35-54.
- Singh, R. P. K. S. O. C. S. P. (1999). " Nutrient requirement for UASB process: a review." *Biochemical Engineering Journal* **3** (1): 35.
- Soubes, M., L. Muxi, A. Fernandez, S. Tarlera et M. Queirolo (1994). " Inhibition of methanogenesis by Cr⁺³ and ammonia." *Biotechnol. Lett.* **16**: 195-200.
- Spaeth, R. et S. Wuertz (2000). Extraction and Quantification of Extracellular Polymeric Substances from Wastewater. Biofilms: Investigative Methods and Applications. H. G. Flemming, U. Szewzyket T. Griebe. Lancaster (Pennsylvania), Technomic publication: 51 - 68.
- Speece, R. E. (1983 a). " Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment." *Environ. Sci. Tech.* **17** (A): 416 - 427.
- Speece, R. E., G. F. Parkin et D. Gallagher (1983). " Nickel stimulation of anaerobic digestion." *Water Research* **17** (6): 677-683.

- Sponza, D. T. (2003). " Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions." *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 375–385.
- Stams, A. J. M., C. M. Plugge, F. A. M. d. Bok, B. H. G. W. v. Houten, P. Lens, H. Dijkman et J. Weijma (2005). " Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors." *Water Science and Technology* **52** (1-2): 13-20.
- Stefanie, J. W. H., O. Elferink, A. Visser, L. W. Hulshoff Pol et A. J. M. Stams (1994). " Sulfate reduction in methanogenic bioreactors." *FEMS Microbiology Reviews* **15** (2-3): 119-136.
- Steyer, J.-P., J. C. Bouvier, T. Conte, P. Gras, J. Harmand et J.-P. Delgenès (2002b). " On-line measurements of COD, TOC, VFA, total and partial alkalinity in anaerobic digestion processes using infra-red spectrometry." *Water Science and Technology* **45** (10): 133-138 (Suite à communication congrès IWA). *Publication commune citée en --*.
- Steyer, J. P., J. C. Bouvier, T. Conte, P. Gras et P. Sousbie (2002a). " Evaluation of a four year experience with a fully instrumented anaerobic digestion process." *Wat Sci Technol* **45** (4-5): 495-502.
- Steyer, J. P., P. Buffiere, D. Rolland et R. Moletta (1999). " Advanced control of anaerobic digestion processes through disturbances monitoring." *Water Research* **33** (9): 2059.
- Stoodley, P., I. Dodds, J. D. Boyle et H. M. Lappin-Scott (1999). " Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure." *Journal of Applied Microbiology* **85**: 19S.
- Stoodley, P., H. M. Lappin-Scott, J. D. Boyle et D. Debeer (1999). " Evolving perspectives of biofilm structure." *Biofouling* **14** (1): 75-90.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies et J. W. Costerton (2002). " Biofilms as complex differentiated communities." *Annual Review of Microbiology* **56**: 187-209.
- Stoodley, P., S. Yang, H. Lappin-Scott et Z. Lewandowski (1997). " Relationship between mass transfer coefficient and liquid flow velocity in heterogeneous biofilms using microelectrodes and confocal microscopy." *Biotechnology and Bioengineering* **56** (6): 681-688.
- Stronach, S. M., T. Rudd et J. N. Lester (1987). " Start-up of anaerobic bioreactors on high strength industrial wastes." *Biomass* **13** (3): 173-197.
- Stryer, L. (1992). *La biochimie*. Medecine Science Flammarion, Paris, 1088 p.
- Sutherland, I. W. (2001(a)). " The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment." *TRENDS in Microbiology* **9** (5): 222-227.

- Sutherland, I. W. (2001(b)). " Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework." Microbiology "Mini-review" **147**: 3-9.
- Suzuki, M., M. S. Rappe et S. J. Giovannoni (1998). " Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity." Appl. Environ. Microbiol. **64** (11): 4522-4529.
- Suzuki, M. T. et S. J. Giovannoni (1996). " Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR." Appl. Environ. Microbiol. **62**: 625-630.
- Switzenbaum, M. S. (1983). " A comparison of the anaerobic filter and the anaerobic expanded/fluidized bed processes." Water Science and Technology (Copenhagen) **15**: 345-358.
- Tanner, M. A., B. M. Goebel, M. A. Dojka et N. R. Pace (1998). " Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants." Appl. Environ. Microbiol. **64** (8): 3110-3113.
- Tasaki, M., Y. Kagamata, N. Kazunori et E. Mikami (1991). " Isolation and characterization of a thermophilic benzoate-degrading, sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermobenzoicum* sp. Nov." Arch. Microbiol. **155**: 348-352.
- Tay, J.-H., S. Jeyaseelan et K.-Y. Show (1996). " Performance of anaerobic packed bed system with different media characteristics." Water Science and Technology **34** (5/6): 453-459.
- Thauer, R. K. (1998). " Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson." Microbiology-Uk **144**: 2377-2406.
- Thauer, R. K., K. Jungermann et K. Decker (1977). " Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria." Bacteriological Reviews **41** (1).
- Thiele, J. H. (1991). Mixed-culture interactions in methanogenesis. Mixed cultures in biotechnology. G. Zeikus et E. A. Johnson. New York, Mc Graw Hill: 261-292.
- Tholozan, J.-L. (1988). Métabolisme des acides gras volatils dans les écosystèmes méthanogènes: application de la RMN du carbone 13, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois: 96.
- Tholozan, J. L., E. Samain, J. P. Grivet et G. Albagnac (1990). " Propionate metabolism in a methanogenic enrichment culture. Direct reductive carboxylation and acetogenesis pathways." FEMS Microbiology Letters **73** (4): 291-297.

- Tijhuis, L., M. C. M. van Loosdrecht et J. J. Heijnen (1994). " Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors." *Biotechnology and Bioengineering* **44**: 595-608.
- Tiwaria, M. K., S. Guhaa, C. S. Harendranathb et S. Tripathia (2005). " Enhanced granulation by natural ionic polymer additives in UASB reactor treating low-strength wastewater." *Wat. Res.* **39** : 3801–3810.
- Trinet, F., R. Heim, D. Amar, H. T. Chang et B. E. Rittmann (1991). " Study of biofilm and fluidization of bioparticles in three-phase liquid fluidized bed reactor." *Water Science and Technology* **23** (Kyoto): 1347-1354.
- Trulear, M. G. et W. G. Characklis (1982). " Dynamics of biofilm processes." *Journal of the Water Pollution Control Federation* **54** (9): 1288-1301.
- Tschech, A. et B. Schink (1985). " Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids." *Arch. Microbiol.* **143**: 52-59.
- Tschech, A. et B. Schink (1986). " Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures." *Arch. Microbiol.* **145**: 396-402.
- Tsuneda, S., H. Aikawa, H. Hayashi, A. Yuasa et A. Hirata (2003). " Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface." *FEMS Microbiology Letters* **223**: 287-292.
- Turan, M. (2000). " Mechanisms of biofilm detachment in anaerobic fluidized bed reactors." *Environmental Technology* **21** (2): 177.
- van den Berg, L. (1984). " Developments in methanogenesis from industrial waste water." *Can J. Microbiol.* **30**: 975-990.
- van den Berg, L. (1986). High rate reactors for methane production. *Biotechnology and Renewable Energy*. M. Moo-Young, S. Hasnainet J. Lamptey, Elsevier Applied Science: 268-275.
- van den Berg, L., K. J. Kennedy et R. Samson (1985). " Anaerobic downflow stationary fixed film reactors: performance under steady-state and non-steady-state conditions." *Water Science and Technology* **17** (Tampere): 89-102.
- van den Berg, L. et C. P. Lentz (1979). Comparison between up and downflow anaerobic fixed film reactors of varying surface-to-volume ratios for the treatment of bean bleaching waste. 34th Purdue University Industrial Waste Conference, Ann Arbor Science, West Lafayette (Indiana).

- van Hoss, C. J. (2005). Force and gradient to interfaces. Interface microorganismes - solution: de la cellule au biofilm. Paris, Jorand, F. Gaboriaud, F. Block, J.C. Thomas, F. Villiéras, F. Lejeune, P.
- van Loosdrecht, M. C. M., D. Eikelboom, A. Gjaltema, A. Mulder, L. Tijhuis et J. J. Heijnen (1995). " Biofilm structures." *Water Science and Technology* **32** (8): 35-43.
- van Loosdrecht, M. C. M. et J. J. Heijnen (1993). " Biofilm bioreactors for wastewater treatment." *TIBTECH* **11**(April): 117-121.
- van Loosdrecht, M. C. M., J. J. Heijnen, H. Eberl, J. Kreft et C. Picioreanu (2002). " Mathematical modelling of biofilm structures." *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 245 - 256.
- van Rompu, K., S. Grusenmeyer et W. Verstraete (1988). Polyurethane carrier reactor to treat wastewater from a starch, modified starches and syrups factory. Proc. 5th Int Symp. On anaerobic digestion (Poster-Papers), M. (Bologne), Tilche A. Rozzi A., Bologna (Italy).
- Verrier, D., F. Roy et G. Albagnac (1987). " Two-phase methanization of solid vegetable wastes." *Biological Wastes* **22** (3): 163-177.
- Vogels, G. D., J. T. Keltjens et C. van der Drift (1988). Biochemistry of methane production. Biology of Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 707-770.
- Ward, D. M., M. J. Ferris, S. C. Nold et M. M. Bateson (1998). " A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** (4): 1353-1370.
- Wawer, C., M. S. Jetten et G. Muyzer (1997). " Genetic diversity and expression of the [NifE] hydrogenase large-subunit gene of *Desulfovibrio* spp. in environmental samples." *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (11): 4360-4369.
- Weiland, P. et A. Rozzi (1991). " The start-up, operation and monitoring of high-rate anaerobic treatment system: discussor's report." *Wat. Sci. Tech.* **24** (8): 255-277.
- Weiland, P. et K. Wulfert (1988). Anaerobic treatment of stillage using different pilot-scale fixed bed reactors in up- and downflow mode of operation. Proc 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, E. R. Hallet P. N. Hobson, Pergamon Press, New York.
- Wen, Z. T. et R. A. Burne (2002). " Functional Genomics Approach to Identifying Genes Required for Biofilm Development by *Streptococcus mutans*." *Applied And Environmental Microbiology* **68** (3): 1196–1203.

- Wheatley, A. (1990). Anaerobic digestion: a waste treatment technology. Elsevier applied science, London, Critical rapports on Applied Chemistry Vol.31, 229.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas et J. S. Mattick (2002). " Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation." *Science* **295** (5559): 1847.
- Whiteley, M., M. G. Banger, R. E. Bumgarner, M. R. Parsek, G. M. Teitzel, S. Lory et E. P. Greenberg (2001). " Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Nature* **413** (25 October 2001): 860-864.
- Widdel, F. (1988). Microbiology and ecology of sulfate - and sulfur-reducing bacteria. Biology Anaerobic Microorganisms. A. J. B. Zehnder. New York, John Wiley & Sons: 469-585.
- Wilderer, P. A., H. J. Bungartz, H. Lemmer, M. Wagner, J. Keller et S. Wuertz (2002). " Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology." *Water Research* **36**: 370-393.
- Wimpeny, J. (2000 a). An overview of biofilm as functional communities. 59th symposium of the society for general microbiology, D. G. e. a. Alison. Society for General Microbiology, University of Exeter (UK).
- Wimpeny, J., W. Manz et U. Szewzyk (2000 b). " Heterogeneity in biofilms." *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 661-671.
- Wingender, J., T. R. Neu et H. C. Flemming (1999). Extraction of EPS. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. Springer-Verlag. New York: 49-72.
- Wood, B. D. et S. Whitaker (1998). " Diffusion and reaction in biofilms." *Chemical Engineering Science* **53** (3): 397-425.
- Wu, M. et R. Hickey (1996). " n-Propanol production during ethanol degradation using anaerobic granules." *Wat. Res.* **30** (7): 1686-1694.
- Wu, W. M., R. F. Hickey et J. G. Zeikus (1991). " Characterization of metabolic performance of methanogenic granules treating brewery wastewater: role of sulfate-reducing bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (12): 3438-3449.
- Xiushan, Y., G. Garuti, R. Farina, V. Parisi et A. Tilche (1988). Process differences between a sludge bed filter and an anaerobic baffled reactor treating soluble wastes. 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion, Monduzzi, A. Tilche, A. Rozzi, Bologna.
- Ye, F. X., Y. X. Chen et X. S. Feng (2005). " Advanced start-up of anaerobic attached film expanded bed reactor by pre-aeration of biofilm carrier." *Bioresource Technology* **96** (1): 115-119.

- Yoda, M., M. Kitagawa et Y. Miyaji (1987). " Long term competition between sulfate-reducing and methane-producing bacteria for acetate in anaerobic biofilm." *Water Research* **21** (12): 1547-1556.
- Young, J. C. et M. F. Dahab (1982). " Operational characteristics of anaerobic packed-bed reactors." *Biotechnology and Bioengineering Symposium Series* **12**: 303-316.
- Young, J. C. et B. S. Yang (1989). " Design considerations for full-scale anaerobic filters." *Research Journal of the Water Pollution Control Federation* **61** (9-10): 1576-1587.
- Yu, H. Q., J. H. Tay et H. H. P. Fang (2001). " The roles of calcium in sludge granulation during uasb reactor start-up." *Water Research* **35** (4): 1052-1060.
- Zandvoort, M. H., R. Geerts, G. Lettinga et P. N. L. Lens (2003). " Methanol degradation in granular sludge reactors at sub-optimal metal concentrations: role of iron, nickel and cobalt." *Enzyme and Microbial Technology* **33** (2-3): 190-198.
- Zarda, B., R. I. Amann, G. Wallner et K. H. Schleifer (1991). " Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides." *J Gen Microbiol.* **137** (Pt 12): 2823-30.
- Zehnder, A. J. B., K. Ingvorrsen et T. Marti (1982). *Microbiology of methane bacteria. Anaerobic Digestion 1981. Proc. 2nd Int. Symp., D. E. Hughes, D. A. Stafford, B. I. Wheatley et al, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam.*
- Zeikus, G. (1980). *Microbial populations in digesters. Anaerobic digestion.* Stafford, Wheatley et Hughes. Londres, Applied Science: 61-87.
- Zellner, G., C. Alten, E. Stackebrandt, E. Conway de Macario et J. Winter (1987). " Isolation and characterization of *Methanocorpusculum parvum*, gen. nov., spec. nov., a new tungsten requiring, coccoid methanogen." *Arch. Microbiol.* **147**: 13-20.
- Zellner, G., M. Gevecke et H. Diekmann (1991). " Start-up and operation of a fluidized-bed reactor oxidizing butyrate by a defined syntrophic population." *Biotechnology Letters* **13** (9): 687-691.
- Zumstein, E., R. Moletta et J.-J. Godon (2000). " Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis." *Environmental Microbiology* **2** (1): 69-78.

Annexes

Annexe 1 - Nomenclature.....	262
Annexe 2 - Liste des figures.....	264
Annexe 3 - Liste des tableaux	270
Annexe 4 - Publications et communications	272

Annexe 1 - Nomenclature

Caractères romains :

a_g	Aire de surface spécifique ($\text{m}^2.\text{m}^{-3}$)
AP	Alcalinité partielle (meq.L^{-1})
AT	Alcalinité totale (meq.L^{-1})
AES	Atomic Emission Spectrometry
AGV	Acide gras volatile
AM	<i>Archaea</i> méthanogènes
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BSR	Bactéries sulfato-réductrices
COT	Carbone organique total
C_{in}	Concentration de carbone organique à l'entrée ($\text{k}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$)
CVA	Charge volumique appliquée ($\text{k}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}.\text{j}^{-1}$)
CSTR	Completely mixed stirred tank reactor (procédé contact anaérobie)
DCO	Demande chimique en oxygène ($\text{k}_{\text{DCO}}.\text{m}^{-3}$)
DGGE	Denaturant Gradient Gel Electrophoresis
dp_{eq}	Diamètre équivalent moyen de la particule (m)
EGCB	Expanded Granular Sludge Blanket (lit de boues expansé)
EPS	Substances polymériques extracellulaires
FA	Lit fixe ascendant
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
IC	Circulation interne
ICP	Inductively Coupled Plasma
LFA	Lit fluidisé ascendant
LFD	Lit fluidisé descendant
LTI	Lit turbulé inverse
MES	Matières en suspension
MS	Matières sèches
MV	Matières volatiles
MVS	Matières volatiles en suspension
MVA	Matières volatiles attachées
PCR	Polymerase chain reaction

Q	Débit de liquide ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RISA	rRNA Intergenic spacer analysis
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TTGE	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TSH	Temps de séjour hydraulique (j)
UASB	Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (lit de boues anaérobies ascendant)
U_g	Vitesse du gaz ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)
V_u	Volume utile (L)
V_e	Volume de l'échantillon (L)
X_i	Fraction volumique du support

Caractères grecs :

ϵ_g	Rétention de gaz (adimensionnel)
ϵ_s	Rétention de liquide (adimensionnel)
ϵ_l	Rétention de solide (adimensionnel)
ϵ_o	Taux de vide en lit statique non tassé (adimensionnel)
ϵ_{so}	Fraction de solide en lit statique non tassé (adimensionnel)
ρ_{aps}	Masse volumique apparente
ρ_s	Masse volumique réelle

Annexe 2 - Liste des figures

Figure 1 : Le traitement par méthanisation des effluents industriels dans le monde : nombres d'installation par type d'industrie (Fruteau <i>et al.</i> 2004)	12
Figure I.1 : Schéma de la chaîne trophique de la méthanogenèse et ses différentes étapes (Zeikus 1980; Thiele 1991; Moletta 1993).	18
Figure I.2 : Evolution de l'énergie libre de Gibbs (ΔG^{*}) des réactions de conversion de l'éthanol, du propionate, du butyrate en acétate et de la production de méthane à partir de H_2/CO_2 en fonction de la pression partielle en hydrogène. [propionate] = [butyrate] = [éthanol] = [acétate] = 1 mM ; $[HCO_3^-] = 100$ mM ; pression en $CH_4 = 0,5$ atm. 1, 2 et 3 : acétogenèse du propionate, du butyrate et de l'éthanol, 4 et 5: méthanogenèse autotrophe (H_2 , CO_2) et acétoclaste.	22
Figure I.3 : Compétition entre les bactéries sulfato-réductrices et les <i>Archaea</i> méthanogènes en fonction du rapport entre la charge organique et la concentration de sulfate (Hao <i>et al.</i> 1996).	26
Figure I.4 : Potentiel rédox des demi-couples impliqués dans les réactions biochimiques	28
Figure I.5 : Différentes configurations des réacteurs à lit fixe, (1) flux ascendant, (2) flux descendant. G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation	37
Figure I.6 : Schéma de principe d'un réacteur à lit de boues (1) à flux ascendant (UASB : Up-flow Anaerobic Sludge Blanket), (2) Hybride, (3) à circulation interne (IC). G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation.....	40
Figure I.7 : Schéma de principe d'un réacteur à lit de boues compartimenté horizontal (1), compartimenté vertical ou à plateau (2). G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation	41
Figure I.8 : Schéma de principe d'un réacteur à lit fluidisé (1) à flux ascendant, (2) à flux descendant, (3) à lit turbulé inverse. G : gaz. S : sortie. A : alimentation. R : recirculation du liquide. P : pompe de recirculation du gaz.....	42
Figure I.9 : Concentrations en biomasse en fonction de différents types de réacteurs (Weiland <i>et al.</i> 1991)	47
Figure I.10 : Régimes de fonctionnement classiquement appliqués aux procédés à fortes charges en fonction de la charge organique de l'effluent et de la concentration en matières en suspension	49
Figure I.11 : Régimes de fonctionnement classiquement appliqués aux procédés à fortes charges : charge organique de l'effluent et capacité épuratoire.....	50
Figure I.12 : Représentation théorique du fonctionnement d'un réacteur biologique.....	55
Figure I.13 : Paramètres influençant le démarrage des réacteurs à forte charge.....	57
Figure I.14 : Progression de la formation d'un biofilm (Characklis <i>et al.</i> 1990).	65

Figure I.15 : Représentation schématique des phases successives de la formation d'un biofilm (Bos <i>et al.</i> 1999).....	66
Figure I.16 : Variation de l'énergie de Gibbs en fonction de la distance entre une bactérie (assimilée à une sphère) et une surface chargée négativement (Hulshoff Pol <i>et al.</i> 2004). G_T représente la somme des énergies libres des forces G_A (Lifshitz-van der Waals) et G_E (électrostatiques).....	68
Figure I.17 : Présentation schématique des différences d'accessibilité des corps sphériques et d'une surface plane (van Hoss 2005).....	69
Figure I.18 : Techniques moléculaires pour étudier des échantillons environnementaux et approche « full cycle RNA » (Wilderer <i>et al.</i> 2002; Dorigo <i>et al.</i> 2005).	82
Figure I.19 : Méthodes d'étude moléculaire des écosystèmes complexes basées sur l'amplification par PCR des ADNr microbiens.	86
Figure II.1 : Schéma synoptique des LTI.....	96
Figure II.2 : Répartition d'un échantillon de 2260 particules de U-Spheres™ non tamisé (brute) par classe de diamètre équivalent et après tamisage	98
Figure II.3 : Schéma synoptique du réacteur pilote à lit fixe	102
Figure II.4 : Support de type Cloisonyle™ non colonisé.....	102
Figure II.5 : Représentation schématique de la stratégie de la charge maximale	105
Figure II.6 : Variation type du débit de gaz en réponse à une perturbation du débit d'alimentation	107
Figure II.7 : Suivi analytique des LTI et techniques associées (les mesures disponibles en ligne sont indiquées en caractères gras).....	108
Figure II.8 : Suivi analytique du LF et techniques associées (les mesures disponibles en ligne sont indiquées en caractères gras).....	109
Figure II.9 : Représentation schématique des flux de carbone pris en compte pour le calcul des bilans massiques.....	116
Figure II.10 : Principe de la microscopie à champ large :	120
Figure II.11 : Principe de la microscopie confocale :	121
Figure II.12 : Représentation schématique de la démarche globale pour la caractérisation et le suivi des populations composant le biofilm anaérobie.	122
Figure III.1 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S bactériens obtenus à partir de l'inoculum et de support prélevé douze heures après l'inoculation.....	132
Figure III.2 : Profils SSCP des régions V3 des ADNr 16S présents dans les solutions de rinçage du support prélevé douze heures après l'inoculation	133

Figure III.3 : Alignement du profil SSCP réalisé à partir du support prélevé douze heures après l'inoculation et ayant subi dix rinçages avec ceux réalisés à partir des solutions du 3 ^{ème} , du 6 ^{ème} , et du 10 ^{ème} rinçage.....	134
Figure III.4 : Alignement du profil SSCP réalisé à partir du support prélevé 12 jours après l'ensemencement et ayant subi 10 rinçages avec celui de la phase liquide du réacteur. .	135
Figure III.5 : Alignement des profils SSCP des solutions de rinçage du support prélevé douze jours après l'inoculation.....	136
Figure III.6 : Profils SSCP réalisés à partir des particules de support et à partir de la phase liquide du réacteur prélevées 12 jours après l'inoculation et le profil SSCP réalisé à partir de la solution du 6 ^{ème} rinçage du support prélevé 12 heures après inoculation	137
Figure III.7 : évolution du rendement épuratoire et de la charge volumique appliquée durant la phase de démarrage.....	141
Figure III.8 : Evolution de la DCO dégradée durant la phase de démarrage	142
Figure III.9 : Evolution du rendement méthane durant la phase de démarrage	143
Figure III.10 : Evolution de la répartition du flux de carbone entrant dans le cas LTI à faibles contraintes	144
Figure III.11 : Evolution de la répartition du flux de carbone entrant dans le cas LTI à faibles contraintes	144
Figure III.12 : Réacteur à fortes contraintes - Production, accumulation, détachement de biomasse et évolution des MVA durant la phase de démarrage	146
Figure III.13 : Réacteur à faibles contraintes - Production, accumulation, détachement de biomasse et évolution des MVA durant la phase de démarrage	146
Figure III.14 : support colonisé au jour 80. Réacteur à fortes contraintes hydrodynamiques (A), réacteur à faibles contraintes hydrodynamiques (B), grossissement x10 (1) x 40 (2)	148
Figure III.15 : Evolution de l'activité spécifique pour chaque réacteur durant la phase de démarrage.....	149
Figure III.16 : Evolution des MVA lors de l'égalsation des vitesses de gaz	150
Figure III.17 : Taux de production, d'accumulation et de détachement de biomasse lors de l'égalsation des vitesses de gaz.....	151
Figure III.18 : Stratégie A - Répartition des différentes formes de carbone organique produites en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol et évolution de la CVA.....	154
Figure III.19 : Stratégie B - Répartition des différentes formes de carbone organique produites en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol et évolution de la CVA.....	155

Figure III.20 : Pourcentage de conversion de l'éthanol en AGV et évolution du rendement de conversion en méthane.....	156
Figure III.21 : Evolution de la CVA et du rendement épuratoire	157
Figure III.22 : Evolution des MVA et des MES	158
Figure III.23 : Stratégie A – Taux de production, d'accumulation et de détachement de biomasse.....	159
Figure III.24 : Stratégie B - Taux de production, d'accumulation et de détachement de biomasse.....	159
Figure III.25 : Variation du débit d'alimentation, du débit de biogaz et de $V_{mesuré}$ lors d'une impulsion de CVA réalisée le 60 ^{ème} jour	161
Figure III.26 : Variation du débit d'alimentation, du débit de biogaz et de $V_{mesuré}$ lors d'une impulsion de CVA réalisée le 26 ^{ème} jour	161
Figure III.27 : Evolution de l'activité spécifique du biofilm	162
Figure III.28 : Stratégie A - évolution de la concentration en acétate, propionate et butyrate	163
Figure III.29 : Stratégie B - évolution de la concentration en acétate, propionate et butyrate	163
Figure III.30 : Variation de la DCO dégradée par le R_A et la R_B durant la période de montée en charge	164
Figure III.31 : Variation du débit d'alimentation, du débit de biogaz et de $V_{mesuré}$ lors d'une impulsion de CVA réalisée le 45 ^{ème} jour	166
Figure III.32 : Evolution du rendement méthane pour les deux réacteurs	167
Figure III.33 : Stratégies A et B - volume de biogaz produit.....	169
Figure III.34 : Stratégie A - Mesure des débits de gaz et d'alimentation, du pH et du volume de gaz cumulé	170
Figure III.35 : Stratégie B - Mesure des débits de gaz et d'alimentation, du pH et du volume de gaz cumulé	171
Figure III.36 : Aligement des profils SSCP des populations bactériennes de l'inoculum (en haut), du biofilm 24 heures après l'inoculation (au centre), et du biofilm le 16 ^{ème} jour pour le R_A et le 23 ^{ème} jour pour le R_B (en bas).	175
Figure III.37 : Réacteur A - Représentation simplifiée des profils SSCP - Evolution des populations bactériennes du 1 ^{er} au 72 ^{ème} jour. Les pics A à M correspondent aux pics de la Figure III.36. Leur identité est présentée dans l'encart au-dessus du graphe.....	176
Figure III.38 : Réacteur B - Représentation simplifiée des profils SSCP - Evolution des populations de bactéries du 1 ^{er} au 72 ^{ème} jour	177

Figure III.39 : Alignement des profils SSCP des populations <i>Archaea</i> de l'inoculum et du biofilm des réacteurs du 1 ^{er} au 72 ^{ème} jour de la phase de démarrage.....	179
Figure III.40 : Proposition de représentation schématique des voies de dégradation de l'éthanol en méthane et dioxyde de carbone privilégiées pour chacun des réacteurs.....	184
Figure III.41 : Observation par microscopie laser confocale et FISH des particules de support colonisées – Double marquage <i>Archaea</i> ARC915 – FAM (rouge) et Chromomycine (bleu) à fort grossissent (A,B,C1) et à faible grossissement (C2)	186
Figure III.42 : Observation par microscopie laser confocale et FISH des particules de support colonisées – Double marquage <i>Archaea</i> ARC915 – FAM (rouge) et bactéries EUB338 - CY3 colorée (vert) à faible (D1) et à fort grossissement (D2)	187
Figure III.43 : Stratégies C1 et C2- évolution de la CVA et du débit d'alimentation.....	191
Figure III.44 : Stratégies C1 et C2- variation du rendement épuratoire et des quantités de DCO dégradée.....	192
Figure III.45 : Stratégie C ₁ - Distribution du carbone organique entrant.....	193
Figure III.46 : Stratégie C ₂ - Distribution du carbone organique entrant.....	194
Figure III.47 : Stratégie C ₁ – évolution de la concentration en AGV	196
Figure III.48 : Stratégie C ₂ – évolution de la concentration en AGV	196
Figure III.49 : Stratégie C ₁ et C ₂ - accumulation de MVA et évolution de la CVA au cours du démarrage.....	197
Figure III.50 : Stratégies C1 et C2- évolution des MVS et du TSH	199
Figure III.51 : Stratégie C ₁ et C ₂ – évolution du pourcentage de biomasse libre et de biomasse fixée en fonction du temps et rapport de concentration en biomasse attachée	200
Figure III.52 : Répartition granulométrique par classe de diamètre équivalent de particules de support colonisées prélevées le 35 ^{ème} jour et de particules de support vierges	201
Figure III.53 : Support colonisé prélevé le 35 ^{ème} jour - réacteur C ₁ et réacteur C ₂ , et support non colonisé (NC), objectifs x10 (a) x 40 (b)	202
Figure III.54 : Evolution de l'activité spécifique de la biomasse.....	203
Figure III.55 : Stratégie C ₁ - évolution de la composition de la phase gazeuse en dioxyde de carbone et méthane et du débit de biogaz	205
Figure III.56 : Stratégie C ₂ - évolution de la composition de la phase gazeuse en dioxyde de carbone et méthane et du débit de biogaz	205
Figure III.57 : Stratégie C ₁ et C ₂ - évolution du rendement méthane	206
Figure III.58 : Stratégie A – Evolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage.....	210

Figure III.59 : Stratégie A et C ₁₁ – Evolution de la concentration en AGV totale	211
Figure III.60 : Démarrage C ₁₁ – Evolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage	212
Figure III.61 : Stratégie C ₁₁ – Evolution du débit de production du biogaz et de sa composition en méthane et dioxyde de carbone durant la phase de démarrage	214
Figure III.62 : Stratégie C ₁₁ - Evolution de l'alcalinité partielle, de l'alcalinité totale, de la concentration en bicarbonates et du pH durant la phase de démarrage	215
Figure III.63 : Stratégie C ou démarrage C ₁₂ – Evolution de la CVA, de la DCO dégradée et du rendement épuratoire lors de la phase de démarrage	216
Figure III.64 : Stratégie C ₁₂ – Evolution des alcalinités partielle et totale, de la concentration en bicarbonates, du pH et du débit d'alimentation durant la phase de démarrage.....	218
Figure III.65 : Evolution des matières sèches attachées (MSA) et des matières volatiles attachées (MVA) mesurées après plusieurs démarrages réalisés selon différentes stratégies	219
Figure III.66 : Support colonisé prélevé sur le réacteur à lit fixe ascendant après 54 jours (A) et après 7 ans de fonctionnement (B).....	220
Figure III.67 : Travaux de Ouichanpagdee et <i>al.</i> (2004) – Evolution des MSA et de la CVA lors du démarrage d'un digesteur à lit fixe ascendant alimenté avec des vinasses de distilleries.....	221

Annexe 3 - Liste des tableaux

Tableau I.1 : Temps de génération à 35°C des bactéries syntrophes connues, isolées de digesteurs, avec différents partenaires.	20
Tableau I.2 : Equation et énergie libre des réactions de dégradation anaérobie de l'éthanol, du propionate et du butyrate.	20
Tableau I.3 : Données thermodynamiques sur la sulfato-réduction (Stams <i>et al.</i> 2005)	26
Tableau I.4 : Principaux accepteurs d'électrons inorganiques participant au processus d'atténuation naturelle (Quintard <i>et al.</i> 2004).....	27
Tableau I.5 : Quelques teneurs en cobalt et en nickel utilisées ou recommandées dans la littérature.	31
Tableau I.6 : Nombre de digesteurs de taille industrielle pour le traitement des effluents des agroalimentaires dans le monde en janvier 2003 (Kleerebezem <i>et al.</i> 2003).	33
Tableau I.7 : Caractéristiques des différents supports (Moletta 2002)	51
Tableau I.8 : Exemples de supports cités dans la littérature pour les biofiltres anaérobie et la partie filtrante des réacteurs hybrides	52
Tableau I.9 : Exemples de supports cités dans la littérature pour les réacteurs à lit mobile. LFA : lit fluidisé ascendant, LFD :lit fluidisé descendant, LTI : lit turbulé inverse.	53
Tableau I.10 : Caractéristiques du démarrage de digesteurs anaérobies à forte charge et vitesse de montée en charge - données bibliographiques	61
Tableau I.11: Composition des EPS.....	78
Tableau II.1 : Caractéristiques des LTI et paramètres opératoires.....	96
Tableau II.2 : Composition chimique du support U-Spheres™.....	97
Tableau II.3 : Caractéristiques générales du support U-Spheres™ utilisé dans les LTI.....	99
Tableau II.4 : Composition en éléments traces pour une solution de vin dilué au 1/10 ^{ème} dont la DCO est égale à 20 g _{DCO} .L ⁻¹	100
Tableau II.5 : Composition de la solution destinée à la complémentation de l'alimentation en éléments métalliques	100
Tableau II.6 : Activité de l'inoculum et quantité de biomasse utilisée pour l'inoculation des LTI	100
Tableau II.7 : Mesure et gamme de concentrations des principaux paramètres des vinasses de distillerie	103
Tableau II.8 : Activité et quantité de biomasse utilisée pour l'inoculation des LF.....	103

Tableau II.9 : Composition de la solution d'hybridation à 20% de formamide	118
Tableau II.10 : Composition de la solution de lavage (préchauffée à 48°C)	118
Tableau II.11 : Liste des sondes et colorants fluorescents utilisés au cours des expériences d'hybridation <i>in situ</i>	118
Tableau II.12 : Filtres utilisés en microscopie à champ large	119
Tableau II.13 : Séquence des amorces utilisées en PCR.....	124
Tableau II.14 : Mélanges réactionnels utilisés pour les PCRs	125
Tableau II.15 : Paramètres de l'amplification par PCR	125
Tableau III.1 Conditions opératoires appliquées pour la montée en charge des réacteurs	130
Tableau III.2 : Stratégie A – Bilan matière du carbone organique au cours de chaque période en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol.....	154
Tableau III.3 : Stratégie B – Bilan matière du carbone organique au cours de chaque période en pourcentage du carbone entrant sous forme d'éthanol.....	155
Tableau III.4 : Affiliation phylogénétique des séquences d'ADNr 16S clonées	178
Tableau III.5 : Réactions potentiellement impliquées lors de la dégradation anaérobie de l'éthanol et valeurs de $\Delta G_o'$	182
Tableau III.6 : Stratégie C ₁ – Distribution du carbone organique au cours de chaque période	193
Tableau III.7 : Stratégie C ₂ – Distribution du carbone organique au cours de chaque période	194
Tableau III.8 : Valeur de la moyenne, de la médiane et intervalle de répartition des diamètres équivalents des objets analysés au granulomètre (particules de support et fragments de biofilm détaché) à partir des échantillons de support colonisé prélevés le 35 ^{ème} jour pour les réacteurs C ₁ et C ₂ , et à partir d'un échantillon de support vierge.....	200

Annexe 4 - Publications et communications

Publications dans des revues scientifiques internationales à comités de lecture

Cresson R., Carrère H., Delgenès J.P., Bernet N. (2006). Biofilm Formation during start-up period of an anaerobic biofilm reactor – impact of nutrient complementation. *Biochemical Engineering Journal* **30**: 55-62.

Cresson R., Escudié R., Carrère H., Delgenès J.P., Bernet N. Influence of hydrodynamic conditions on methanogenic inverse turbulent bed bioreactor start-up phase. *Water Research* (sous presse).

Cresson R., Latrille E., Steyer J.P., Carrère H., Delgenès J.P., Bernet N. Comparative study of start-up strategies for anaerobic three phase biofilm reactors. *Soumis à Biotechnology Progress*.

Cresson R., Bernet N., Delgenès J.P., Dabert P. Influence of operational conditions on microbial population dynamic during start-up of high rate anaerobic biofilm reactor a comparative study. *En préparation*.

Cresson R., Latrille E., Steyer J.P., Delgenès J.P., Bernet N. Impact of hydraulic retention time on start-up of anaerobic inverse turbulent bed bioreactor. *En préparation*.

Communications orales

Cresson R., Dabert P., Carrere H., Godon J. J., Delgenès J.P. (2004). Utilisation d'outils moléculaires - PCR SSCP – pour la détection précoce de la colonisation d'un support par un écosystème bactérien complexe. 5ème congrès de la SFM, Bordeaux.

Cresson R., Carrère H., Bernet N., Delgenès J.P. Advanced start-up strategy of an anaerobic three-phase turbulent bed biofilm reactor treating winery wastewater (2005). VIII Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (IWA) Punta del Este, Uruguay.

Cresson R., Escudié R., Bernet N., Carrere H., Delgenès J.P. (2005). Effet des conditions hydrodynamiques sur le démarrage d'un réacteur de méthanisation à lit turbulent inverse. 10ème congrès de la SFGP, Toulouse.